Regulation des β3-Tubulingens von Drosophila melanogaster während der Differenzierung des mesodermalen Keimblatts

Alexander Gasch

Disbui. München
1989

DUKE
UNIVERSITY
LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0062

Regulation des ß3-Tubulingens von *Drosophila melanogaster* während der Differenzierung des mesodermalen Keimblatts

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Alexander Gasch
aus Berlin

München, 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. David

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jäckle

Sondervotum: Dr. habil. R. Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Die vorliegende Arbeit wurde im Genzentrum des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Dr. habil. R. Renkawitz-Pohl angefertigt.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. R. Renkawitz-Pohl für die große Anteilnahme an meiner Dissertation bedanken. Nur durch ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft konnte die Arbeit in dieser Form durchgeführt werden.

Herrn Prof. Dr. Ch. David danke ich für sein stetes Interesse und die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Herrn U. Hinz für seine ständige Kooperations- und Diskussionsbereitschaft sowie seine Hilfsbereitschaft bei der Benutzung des Vax-Computers.

Danken möchte ich Herrn F. Michiels für die nützlichen Ratschläge und Hilfe bei der DNA-Sequenzierung, Herrn Dr. M. Cross für die Korrektur englischsprachiger Manuskripte sowie Frau U. Cross und Frau B. Kessler für die Hilfe bei Plasmidisolierungen und Fliegenzucht. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Mertz und Frau D. Weigant für die Synthese von Oligonukleotiden.

Frau D. Leiss danke ich für das anti-ß3-Tubulin-Antiserum und für die vergleichenden immunhistochemischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. J. Campos-Ortega danke ich für die Einweisung in die Embryonalentwicklung von *Drosophila*.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
3.	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1.	**Material**	10
3.1.1.	Geräte	10
3.1.2.	Chemikalien	10
3.1.3.	Radioisotope	11
3.1.4.	Plasmide und synthetische Oligonukleotide	11
3.1.5.	Antikörper	12
3.1.6.	Enzyme und "Kits"	12
3.1.7.	Puffer und Medien	13
3.1.8.	Bakterien und Phagen	13
3.1.9.	Fliegenstämme	14
3.1.10.	Verschiedenes	14
3.2.	**Methoden**	15
3.2.1.	*Drosophila*-Zucht	15
3.2.2.	Nukleinsäure-Präparation	16
3.2.2.1.	Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*	16
3.2.2.1.1.	Isolierung aus Einzelkolonien	16
3.2.2.1.2.	Isolierung aus Großkulturen	16
3.2.2.2.	Präparation von λ-Phagen-DNA	17
3.2.2.3.	Präparation von Gesamt-RNA aus *Drosophila*	19
3.2.2.3.1.	Standardverfahren	19
3.2.2.3.2.	Mikromethode für injizierte Embryonen	20
3.2.3.	Gelelektrophoresen	20
3.2.3.1.	DNA in Agarose-Gelen	20
3.2.3.2.	RNA in denaturierenden Agarose-Gelen	21
3.2.3.3.	DNA in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen	21
3.2.4.	Subklonierungen	23
3.2.4.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	23
3.2.4.2.	Präparation von Restriktionsfragmenten	23
3.2.4.3.	Auffüllen überhängender 5´-Enden mit Klenow-Fragment	24
3.2.4.4.	Ligation von DNA	24
3.2.4.4.1.	Ligation von Restriktionsfragmenten mit synthetischer Linker-DNA	24
3.2.4.4.2.	Ligation von Restriktionsfragmenten mit Vektor-DNA	25

3.2.4.5. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* HB101 25
3.2.4.6. Transformation von *E. coli* HB101 25
3.2.5. Radioaktive Markierung von DNA 26
3.2.5.1. Nicktranslation 26
3.2.5.2. 5´-Endmarkierung mit Polynukleotidkinase 26
3.2.5.2.1. Dephosphorylierung 27
3.2.5.2.2. Kinase-Reaktion 27
3.2.6. Sequenzierung von DNA 28
3.2.6.1. Basenspezifische chemische Spaltung 28
3.2.6.2. Enzymatische Sequenzierung von Plasmid-DNA 30
3.2.7. Transfer und Detektion von Nukleinsäuren 31
3.2.7.1. "Screening" einer λ-Bank 31
3.2.7.2. Transfer und Detektion von RNA 33
3.2.8. Kartierung von Exons an RNA 34
3.2.8.1. S1-Nuklease-Kartierung 34
3.2.8.2. "Primer Extension"-Analyse 34
3.2.9. Mikroinjektion von *Drosophila*-Embryonen 35
3.2.9.1. Vorbehandlung der DNA 35
3.2.9.2. Vorbereiten der Embryonen für die Injektion 35
3.2.9.3. Injektion 36
3.2.9.4. Nachbehandlung von injizierten Embryonen 37
3.2.10. Immunhistochemische Färbung von *Drosophila*-Embryonen 38

4. ERGEBNISSE 40

4.1. Analyse der Struktur des ß3-Tubulingens 40
4.1.1. Klonierung des ersten Exons und des Promotorbereiches 40
4.1.2. Lokalisierung des Transkriptionsstarts 43
4.1.3. Sequenzanalyse des ersten Exons und des Promotorbereiches 48

4.2. Analyse der Regulation des ß3-Tubulingens 50
4.2.1. Analyse transienter Expression nach Mikroinjektion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen in *Drosophila*-Embryonen 50
4.2.1.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen zum Studium der transienten Expression 50
4.2.1.2. Nachweis der korrekten Initiation der Transkription 53
4.2.2. Vergleich der gewebespezifischen Expression des ß3-Tubulingens mit der verschiedener ß3/*lacZ*-Fusionsgene in transgenen Embryonen 57
4.2.2.1. Expression des ß3-Tubulingens 57
4.2.2.2. Nachweis *cis*-regulierender Sequenzen im 5´-benachbarten Bereich des ß3-Tubulingens 62

4.2.2.2.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Genen mit Fusion im 5´-untranslatierten Bereich des ß3-Tubulingens und Klonierung in den pW8-Vektor 62
4.2.2.2.2. Nachweis "genereller" *cis*-agierender Elemente in der Nähe des Transkriptionsstarts 65
4.2.2.2.3. Lokalisierung eines für die Expression in der somatischen und der Herzmuskulatur notwendigen Bereiches zwischen -1,2 und -6,0 kb 66
4.2.2.3. Nachweis *cis*-regulierender Sequenzen im ersten Intron des ß3-Tubulingens 68
4.2.2.3.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Genen mit Fusion im aminosäurekodierenden Bereich des ß3-Tubulingens und Klonierung in den pW8-Vektor 68
4.2.2.3.2. Lokalisierung eines für die Expression in der viszeralen Muskulatur notwendigen "Enhancer"-Elementes im ersten Intron des ß3-Tubulingens 75
4.2.2.4. Vergleich der Expression des ß3-Tubulingens mit der von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen in dorsalisierten Mutanten 77

5. DISKUSSION 82

5.1. Struktur des ß3-Tubulingens 82
5.1.1. Das ß3-Tubulingen besitzt ein großes Intron an konservierter Position 82
5.1.2. Der Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens ist in Embryonen und Puppen identisch 83
5.1.3. Der Promotor des ß3-Tubulingens besitzt eine ungewöhnliche Struktur 84

5.2. Regulation des ß3-Tubulingens 86
5.2.1. Nahe am Transkriptionsstart gelegene Sequenzen verleihen dem ß3-Promotor konstitutive Eigenschaften 86
5.2.2. Distal von -1,2 kb gelegene Sequenzen regulieren die positionsunabhängige Expression des ß3-Tubulingens in der somatischen und der Herzmuskulatur 88
5.2.3. Ein "Enhancer"-Element im ersten Intron des ß3-Tubulingens ist für die korrekte Expression in der viszeralen Muskulatur notwendig 88
5.2.4. Die Regulation des ß3-Tubulingens als Modellsystem für die hierarchische Genaktivierung im Mesoderm 89

6. LITERATURVERZEICHNIS 92

ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
b(p)	Basen(paare)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	"copy"-DNA
CTP	Cytidintriphospat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
kb	Kilo-Basenpaare
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N´-bis(2-ethansulfonsäure)
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-ß-D-Galactopyranosid

1. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Problemfeld intensiver Forschung in der Molekularbiologie von *Drosophila* ist die Aufklärung der genetischen Programme, die die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zu einem komplexen Organismus kontrollieren. Die Expression des ß3-Tubulingens von *Drosophila melanogaster* beginnt während der frühen Embryogenese mit den ersten Zeichen einer Zelldifferenzierung im mesodermalen Keimblatt. Die Regulation dieses Gens stellt somit ein geeignetes Modellsystem dar, mit dem die genetische Kontrolle der frühen Mesodermentwicklung untersucht werden kann.
Als Vorraussetzung für diese Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst das vollständige ß3-Tubulingen aus einer genomischen Bank isoliert, der Transkriptionsstart kartiert und der Promotorbereich sequenziert.
Zur Analyse der Regulation des ß3-Tubulingens wurden verschiedene Promotordeletionen im 5´-untranslatierten Bereich mit dem *lacZ*-Gen von *E. coli* fusioniert. Diese Fusionsgene wurden in *Drosophila*-Embryonen mikroinjiziert und ihre transiente Expression mittels S1-Analyse untersucht. So konnte gezeigt werden, daß die Transkription dieser Fusionsgene an der korrekten Stelle initiiert. Nach Keimbahntransformation dieser Fusionsgene zeigte sich, daß die Expression des ß3-Tubulingens in embryonalen Derivaten des Mesoderms durch räumlich getrennte, *cis*-agierende Elemente reguliert wird. Als verantwortlich für die Expression in der somatischen Muskulatur erwies sich der Bereich zwischen -6,0 und -1,2 kb relativ zum Transkriptionsstart. Expression in der viszeralen Muskulatur konnte jedoch nur dann beobachtet werden, wenn die Fusion zum *lacZ*-Gen im zweiten Exon des ß3-Tubulingens durchgeführt wurde. Sequenzen im ersten Intron des ß3-Tubulingens erwiesen sich als notwendig für die Expression in diesem Gewebe. Es konnte gezeigt werden, daß diese Sequenzen als gewebespezifischer "Enhancer" wirken, da sie diese Spezifität der Expression auch hinter dem Indikatorgen vermitteln.
Außerdem wurde die Expression von ß3-Tubulin in dorsalisierten Embryonen untersucht, wodurch das Vorhandensein dieser Tubulin-Variante in einigen Zellen des Nervensystems nachgewiesen wurde. Als beteiligt an der Expression in diesen Zellen erwiesen sich ebenfalls Sequenzen im ersten Intron des ß3-Tubulingens.
Die Expression des ß3-Tubulingens in verschiedenen Derivaten des Mesoderms wird durch mindestens zwei voneinander räumlich getrennte Elemente reguliert. Zur weiteren Analyse dieser Regulation, mit dem Ziel einer Verknüpfung zu früher in der Embryogenese exprimierten Transkriptionsfaktoren, hat die vorliegende Arbeit die Grundlage gelegt.

2. EINLEITUNG

Eine der wohl komplexesten und weitreichendsten Fragestellungen in der Biologie ist die Frage nach den genetischen Programmen, die die Entwicklung von einer befruchteten Eizelle zu einem hochorganisierten, vielzelligen Organismus kontrollieren. Zur Untersuchung dieser Fragestellung erwies sich die Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, als besonders geeignetes Untersuchungsobjekt.
Als wichtige Vorteile von *Drosophila* bei der Charakterisierung vielfältigster Mutationen, die eine korrekte Entwicklung stören, stellten sich schon frühzeitig die kurze Generationszeit und die hohe Anzahl an Nachkommen heraus (Übersichten früher genetischer Arbeiten bei *Drosophila* geben Oliver, 1976 und Sturtevant, 1965).
Für die molekulare Analyse der durch solche Mutationen betroffenen Gene, erwiesen sich das kleine Genom und das Vorhandensein polytäner Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen larvaler *Drosophilae* als entscheidende Vorteile. Letztere erlauben eine Korrelation zwischen kreuzungs- und cytogenetischer Kartierung solcher Mutationen und der betroffenen Gene. Dabei erwies sich die Methode der *in situ*-Hybridisierung (Pardue, 1986) als sehr hilfreich bei der cytogenetischen Lokalisation klonierter Gene.
Durch das Einführen verschiedener Methoden, wie der Mikroklonierung (Scalenghe et al., 1981), Insertionsmutagenese (Bingham, 1981; Searles et al., 1982) und dem "Enhancer trapping" (O`Kane und Gehring, 1987; Hugo Bellen, persönliche Mitteilung) ist es heutzutage in Verbindung mit der Methode des "chromosomal-walking" (Bender et al., 1983) möglich, praktisch jedes *Drosophila*-Gen zu isolieren, selbst wenn das Genprodukt unbekannt ist.
Ein entscheidender Vorteil von *Drosophila* für molekulargenetische Studien besteht in dem Vorhandensein eines ausgezeichneten Keimbahn-Transformationssystems (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982). Hierdurch ist es möglich, die Expression *in vitro*-modifizierter Gene, nach Reintegration ins Genom, im Verlauf der gesamten Entwicklung zu verfolgen.
Die molekulare Analyse verschiedenster *Drosophila*-Gene und das Studium ihrer Expression hat in den letzten Jahren einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der genetischen Kontrolle grundlegender entwicklungsbiologischer Differenzierungsprozesse leisten können. Vor allem hinsichtlich der morphogenetischen Programme, die die korrekte metamere Entwicklung des Embryos entlang der anterior/posterior-Achse steuern, ereignete sich eine regelrechte Wissensexplosion. Diese Programme beginnen mit maternal, bereits asymetrisch in der Oozyte gespeicherter genetischer Information, die nach der Fertilisation eine Kaskade auf

der Ebene der Transkriptions-Regulation in Gang setzt (zur Übersicht siehe Akam, 1987 und Ingham, 1988). Über eine Vielzahl aktivierender und reprimierender Wechselwirkungen kommt es nach der Manifestation eines oder mehrerer, maternal-determinierter Gradienten (zur Übersicht siehe Nüsslein-Volhard et al., 1987) zur aufeinanderfolgenden Aktivierung der "gap"-, "pair rule"- und "segment polarity"-Gene (zur Übersicht siehe Ingham, 1988). Viele dieser Gene kodieren potentielle Transkriptionsfaktoren (siehe z.B. Gaul und Jäckle, 1987; Levine und Hoey, 1988), wodurch eine direkte Kontrolle auf der Ebene der Transkription sehr wahrscheinlich ist. Einige kodieren Proteine, die der interzellulären Kommunikation dienen und spielen so möglicherweise bei der Differenzierung benachbarter Zellen eine wichtige Rolle (Rijsewijk et al., 1987). Diese Wechselwirkungen führen zu einer metameren Unterteilung in der frühesten Embryonalentwicklung, während der äußerlich noch keine Zeichen einer Segmentierung erkennbar sind. Die Identität der einzelnen "Segmentanlagen" wird durch eine parallel verlaufende Aktivierung der homeotischen Gene des Antennapedia- und des Bithorax-Komplexes geregelt. Die Expressions-Domänen der verschiedenen homeotischen Gene werden ebenfalls durch Aktivierung und Reprimierung auf verschiedenen Ebenen der oben erwähnten Segmentierungsgene festgelegt (Übersichten geben Akam, 1987 und Ingham, 1988).

Durch das Ablaufen der bis hierher geschilderten genetischen Programme erlangt jede Zelle die, für ihre relative Position entlang der anterior/posterior-Achse, notwendige Information. Wie eine Zelle gleichzeitig Information über ihre Lokalisation entlang der dorso/ventral-Achse erhält, ist jedoch bisher weit weniger gut untersucht. Bekannt ist, daß bei der Erlangung dieser Positionsinformation mindestens zwanzig verschiedene Loci beteiligt sind (zur Übersicht siehe Anderson und Nüsslein-Volhard, 1986, Anderson, 1987 und Levine, 1988). Bezüglich der nach Mutation beobachteten ventralisierten bzw. dorsalisierten Phänotypen lassen sich die beteiligten Gene in zwei Gruppen einteilen. Ventralisierte Embryonen zeigen ein partielles bis völliges Fehlen der dorsalen Epidermis, was mit einer entsprechenden Vergrößerung des ventrolateralen neurogenen Ektoderms einhergeht. Dorsalisierten Embryonen hingegen fehlen die sich normalerweise aus ventral und lateral liegenden Zellen entwickelnden Gewebe, wie die mesodermalen Derivate, die ventrale Epidermis und das ventrale Nervensystem. Statt dessen scheinen die ventral gelegenen Zellen eines solchen Embryos eine "dorsale" Entwicklungsrichtung einzuschlagen (Anderson, 1987).

Wie dies auch für die anterior/posterior-Achse gilt, kommt bei der Festlegung der dorso/ventral-Polarität maternal exprimierten

Genen eine entscheidende Bedeutung zu. Der überwiegende Anteil der Mutationen mit einem maternalen Effekt resultiert in einem dorsalisierten Phänotyp (Anderson, 1987). Zur Entwicklung ventraler bzw. lateraler Derivate im Embryo ist also die Funktion dieser Gene während der Oogenese notwendig. Drei dieser Gene, *dorsal*, *Toll* und *snake*, wurden in der Zwischenzeit kloniert, von denen jedoch keines in der Oozyte bereits asymetrisch exprimiert ist (siehe Levine, 1988 und darin zitierte Literatur).
Neben den in der Oogenese exprimierten, gibt es eine Reihe verschiedener zygotisch exprimierter Gene, die man ebenfalls in die ventralisierende bzw. dorsalisierende Gruppe einreihen kann (Anderson, 1987). Die beobachteten Phänotypen zeigen jedoch im Vergleich mit denen der maternalen Loci einen weniger ausgeprägten bzw. einen räumlich stärker begrenzten Effekt. Von insgesamt sieben bekannten dieser Loci wurden fünf bisher kloniert. Ihre Analyse ergab Parallelitäten zu den anfangs erwähnten Segmentierungsgenen. Die Transkription dieser Gene beschränkt sich auf eine begrenzte Domäne entlang der dorso/ventral-Achse (von dorsal nach ventral: *zerknüllt*, *decapentaplegic*, *single minded* und *twist*; siehe Ingham, 1988 und darin zitierte Literatur). Für *snail*, neben *twist* das einzige bekannte zygotisch exprimierte Gen das der dorsalisierenden Gruppe angehört, wurde die Verteilung der Transkripte bisher nicht untersucht. Die fünf bisher klonierten Gene kodieren mögliche Transkriptionsfaktoren mit der Ausnahme von *decapentaplegic*, das eine starke Homologie zum Wachstumsfaktor TGF-ß aufweist (Padgett et al., 1987) und somit wahrscheinlich als interzelluläres Signalprotein an der Etablierung der dorso/ventral-Polarität beteiligt ist. Eine, der Unterteilung entlang der anterior/posterior-Achse, analoge Situation durch zygotisch exprimierte Gene ist also wahrscheinlich.
Vieles deutet darauf hin, daß das in der Oozyte transkribierte *dorsal*-Gen am Ende einer maternalen Kaskade steht und im Embryo die Überleitung zur lokalisierten Transkription, zumindest einiger, der zygotisch exprimierten Gene bewerkstelligt. Zum einen ergab die DNA-Sequenzanalyse des *dorsal*-Gens eine deutliche Homologie zum Onkogen *v-rel* (Steward, 1987), das ein im Kern lokalisiertes Phosphoprotein kodiert (Gilmore und Temin, 1986). Zum anderen zeigte sich, wie nach "rescue"-Experimenten von *dorsal*-Embryonen (durch Mikroinjektion von Wildtyp-Cytoplasma) bereits vermutet (Santamaria und Nüsslein-Volhard, 1983), daß das *dorsal*-Protein im Blastoderm in Form eines Gradienten vorliegt (Steward et al., 1988). Für ein (direktes oder indirektes) Anschalten der Expression von *twist*, möglicherweise auch *snail*, durch das *dorsal*-Protein spricht dies in Verbindung mit der von Simpson (1983) beschriebenen Wechselwirkung: Sowohl für *twist* als auch für *snail*

heterozygote Embryonen zeigen einen sonst nicht zu beobachtenden dominanten Effekt, wenn ihre Mütter heterozygot für *dorsal* waren. Die wahrscheinlich verminderte Konzentration des *dorsal*-Proteins in solchen Embryonen könnte möglicherweise ventral nicht mehr hoch genug sein, um die Transkription des *twist*- und des *snail*-Gens hinreichend zu aktivieren. Es wurde zudem spekuliert, daß das *dorsal*-Produkt neben dieser Aktivierung von *twist* und *snail* auch an der Repression der dorsal exprimierten Gene, *zerknüllt* und *decapentaplegic*, in ventralen Regionen beteiligt sein könnte (Levine, 1988).
Ähnlich wie im Falle der anterior/posterior Achse scheint auch für die dorso/vental-Achse ein hierarchisches System verschiedener maternal und zygotisch exprimierter Transkriptionsfaktoren und Signalproteine zu existieren, das während der frühen Embryogenese jede Zelle mit der für sie notwendigen Positionsinformation versorgt. Wie diese Information jedoch benutzt wird, um im Laufe der weiteren Differenzierung dieser Zellen, je nach Position, völlig unterschiedliche Gene, sogenannte Effektorgene, zu exprimieren und dadurch die Morphogenese der verschiedenen Gewebe entlang der dorso/ventral-Achse einzuleiten, ist bisher völlig ungeklärt. Das Studium der Expression und Regulation solcher Effektorgene und die Identifikation der sie regulierenden *trans*-agierenden Faktoren sollte dabei helfen, die Lücke zu den oben erwähnten Kontrollgenen zu schließen. Wie weiter unten beschrieben, erwies sich das ß3-Tubulingen von *Drosophila melanogaster* als hervorragendes Modellsystem bei einer solchen Fragestellung. Bevor jedoch hierauf weiter eingegangen wird, soll zunächst eine kurze Einführung in das System der Tubuline und der sie kodierenden Gene gegeben werden.
Mikrotubuli sind lange röhrenförmige Strukturen, die in jeder eukaryontischen Zelle vorkommen und eine Vielzahl verschiedener Funktionen haben. So sind sie als strukturelle und bewegliche Komponenten am Aufbau einer Vielzahl verschiedener Strukturen beteiligt. Dazu gehören der mitotische und meiotische Spindelapparat, das Zytoskelett, sowie Cilien und Flagellen. Außerdem sind sie an Organellenbewegung, neuronalem Transport, sowie Exo- und Endozytose beteiligt (zur Übersicht siehe Roberts und Hyams,1979).
Mikrotubuli sind aus Heterodimeren von α- und ß-Tubulin aufgebaut, die beide ein Molekulargewicht von ca. 55 kD besitzen. α- und ß-Tubulin gehören zu den evolutionär am stärksten konservierten Proteinen (Cleveland und Sullivan, 1985; Sullivan und Cleveland, 1986; Pratt et al., 1987).
In fast allen bisher untersuchten Eukaryonten werden α- und ß-Tubuline von kleinen Genfamilien kodiert (zur Übersicht siehe Raff 1984; Cleveland und Sullivan, 1985). Dieser Befund bestärkte die

schon früher formulierte Multitubulin-Hypothese (Fulton und Simpson, 1976). Mit ihr wurde postuliert, daß funktionell unterschiedliche Tubuline eines Organismus auch von verschiedenen Genen kodiert werden. Das Vorhandensein mehrerer Gene für α- und ß-Tubulin könnte so zur funktionellen Vielfalt der Mikrotubuli in einem Organismus beitragen. Daß diese Gene hingegen für funktionell gleichwertige Proteine kodieren, ist ebenso vorstellbar. Die treibende Kraft für die Entstehung von Genfamilien im Laufe der Evolution läge somit in einer für den Organismus besser regulierbaren Expression dieser Proteine. Wenngleich wahrscheinlich beiden dieser gegensätzlichen Theorien in verschiedenen Systemen eine Bedeutung zukommt, so gibt es doch starke Indizien, die für die letztere Theorie sprechen. So besitzen zwei der ß-Tubulingene des Huhns, die durch eine relativ kurz zurückliegende Duplikation entstanden sein müßen, zwar fast identische Aminosäuresequenzen (99,5%), zeigen jedoch völlig unterschiedliche Expressionsspezifitäten (Sullivan et al., 1985). Zum anderen kodiert das während der Spermatogenese exprimierte ß2-Tubulingen von *Drosophila melanogaster* offensichtlich für ein multifunktionelles Protein, wie durch die Analyse von Mutanten (Kemphues et al., 1982; Raff, 1984) und durch Immunlokalisation mit Antikörpern gegen ß2-Tubulin gezeigt werden konnte (Kaltschmidt, B., Leiss, D., Glätzer, K. H., Michiels, F. und Renkawitz-Pohl, R., in Vorbereitung). Dieses ß-Tubulin nimmt nicht nur am Aufbau der Flagellen teil, sondern ist auch an der Bildung der meiotischen Spindeln und der cytoplasmatischen Mikrotubuli beteiligt. In diesem Fall wird die unterschiedliche Funktion verschiedener Mikrotubuli also nicht durch eine unterschiedliche Primärstruktur des daran beteiligten ß-Tubulins reflektiert. Dabei darf jedoch nicht übersehen werden, daß eine unterschiedliche funktionelle Spezifität verschiedener Mikrotubuli auch durch andere Mechanismen vermittelt werden kann. So wurden für verschiedene Mikrotubuli derselben Zelle Unterschiede in der posttranslationellen Modifikation der beteiligten Tubuline beschrieben (Gundersen et al., 1984; L`Hernault und Rosenbaum, 1985). Aber auch die unterschiedliche Verteilung Mikrotubuli-assoziierter-Proteine könnte bei der funktionellen Vielfalt der Mikrotubuli eine wichtige Rolle spielen (Bloom et al., 1984; Huber und Matus, 1984; Binder et al., 1985).

Bei *Drosophila* kodieren je vier Gene für α- und ß-Tubulin. Die vier α-Tubulingene wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und verschiedenen Orten des dritten Chromosoms zugeordnet (Kalfayan und Wensink, 1981; Mischke und Pardue, 1982; Natzle und McCarthy, 1984, siehe Tabelle 1). Diese Gene werden im Laufe der Entwicklung unterschiedlich exprimiert (Kalfayan und Wensink, 1982; Natzle und McCarthy, 1984; Theurkauf et al., 1986). Die α1-

und α3-Tubulingene werden konstitutiv exprimiert. Transkription des α2-Tubulingens konnte nur in Puppen und männlichen Fliegen beobachtet werden (möglicherweise Testis-spezifisch). Transkripte des α4-Tubulingens finden sich hingegen nur in jungen Embryonen und Ovarien, wo sie in den Nährzellen synthetisiert werden.

Tubulingen	Genort	Größe der mRNA	Expressionsspezifität
α1	84B	1,8 kb	konstitutiv, auf hohem Niveau
α2	85E	1,7 kb	männchen-spezifisch, wahrscheinlich in Testes
α3	84D	2,0 kb	konstitutiv, auf niedrigem Niveau
α4	67C	1,7 kb	maternal, in Nährzellen
β1	56D	1,8 kb	konstitutiv, auf hohem Niveau
β2	85D	2,2 kb	gewebespezifisch, in Testes
β3	60C	2,5 kb	mesodermal, in Embryonen und Puppen
β4	97F	1,7 kb	konstitutiv, auf niedrigem Niveau

Tabelle 1: Tubulingene von *Drosophila melanogaster* (Literaturangaben siehe Text)

Die Sequenzen der konstitutiv exprimierten α1- und α3-Tubuline sind mit einer Übereinstimmung von 99,5% fast identisch (Theurkauf et al., 1986). Hingegen kodieren das männchen-spezifische α2-Tubulingen und in extremem Maße das maternal exprimierte α4-Tubulingen für divergente Proteine. Die Sequenz von α4-Tubulin stellt mit einem Aminosäureaustausch von 33% gegenüber α1-Tubulin die größte Abweichung zu allen bisher bekannten α-Tubulinsequenzen dar.
Die vier ß-Tubulingene von *Drosophila* sind ebenfalls an unterschiedlichen Orten im Genom lokalisiert (Natzle und McCarthy, 1984; Bialojan et al., 1984; siehe Tabelle 1). Das Studium ihrer

Expression erlaubte eine Zuordnung zu den drei bekannten isoelektrischen Varianten ß1, ß2 und ß3 (Kemphues et al., 1979; Loyd et al., 1981; Raff et al., 1982). Das ß1- und das ß4-Tubulingen zeigen konstitutive Expression (Natzle und McCarthy, 1984; Bialojan et al., 1984), das letztere jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau, weshalb die zugehörige Proteinvariante wahrscheinlich bisher nicht entdeckt werden konnte.
Expression des ß2-Tubulingens ist Testes-spezifisch (Bialojan et al., 1984; Natzle und McCarthy, 1984) und läßt sich während der Larvalentwicklung erstmalig nachweisen (Kaltschmidt, B., Leiss, D., Glätzer, K. H., Michiels, F. und Renkawitz-Pohl, R., in Vorbereitung). Wie bereits erwähnt wurde, beteiligt sich das ß2-Tubulin im Verlauf der Spermatogenese am Aufbau funktionell verschiedenartiger Mikrotubuli (Kemphues et al., 1982; Kaltschmidt et al., in Vorbereitung). Ein Sequenzvergleich proteinkodierender Bereiche des ß1- und ß2-Tubulingens ergab für die Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 95% (Michiels et al., 1987), vergleichbar mit der Übereinstimmung zwischen den ebenfalls konstitutiv und Männchen-spezifisch exprimierten α1- und α2-Tubulingenen (Theurkauf et al., 1986).
Das ß3-Tubulingen kodiert für die von Raff et al. (1982) beschriebene, in der mittleren Embryogenese vorhandene Proteinvariante, deren Sequenz im Vergleich zum konstitutiv exprimierten ß1-Tubulin stark divergiert (Rudolph et al., 1987; Michiels et al., 1987). Transkripte des ß3-Tubulingens finden sich nicht nur während der mittleren Embryogenese, sondern auch während der Metamorphose (Bialojan et al., 1984; Gasch et al., 1988).
In situ-Hybridisierungen an Embryo-Schnitte zeigten, daß die Transkription dieses Gens nach Beendigung der Gastrulation im mesodermalen Keimblatt beginnt (Gasch et al., 1988). Bis in die späte Embryogenese können in den mesodermalen Derivaten Transkripte dieses Gens beobachtet werden. Eine entsprechende Verteilung wurde in der Zwischenzeit auch für ß3-Tubulin beschrieben (Leiss et al., 1988), auf die im Verlauf dieser Arbeit noch genauer eingegangen werden soll (siehe Abschnitt 4.2.2.1.). Auch während der Metamorphose, in der Phase des Aufbaus der adulten Muskulatur, findet sich ß3-Tubulin in mesodermalen Zellen (D. Leiss, R. Renkawitz-Pohl und M. Bate, persönliche Mitteilung).
Die Expression des ß3-Tubulingens während der Embryogenese beginnt mit den ersten Zeichen einer Differenzierung mesodermaler Zellen. Daher bietet sich die Regulation dieses Gens als geeignetes Modellsystem an, mit dem die genetische Kontrolle früher Differenzierungsprozesse im Mesoderm untersucht werden kann. Um solche Analysen zu ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens lokalisiert und

dann die Regulation des Gens untersucht werden. Dabei war es von großem Interesse festzustellen, ob die Expression dieses Gens in verschiedenen Derivaten des Mesoderms durch ein gemeinsames oder aber verschiedene *cis*-agierende Elemente reguliert wird. Die Beantwortung dieser Frage sollte als Grundlage für eine Charakterisierung der an der Regulation beteiligten *trans*-agierenden Faktoren dienen. Wie dies oben bereits angedeutet wurde, besteht das längerfristige Ziel in der Entschlüsselung der regulatorischen Kaskade zwischen Kontrollgenen für die Mesodermbildung (*twist* und *snail*) und einem für differenzierte Zellen charakteristischen Effektorgen (ß3-Tubulingen).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Entwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Gevamatic 110
Fotomikroskop	Leitz
Geltrockner	Biorad 483
Kapillarenziehgerät	Kopf, Vertical Pipette Puller 720
Kühlzentrifugen	DuPont Sorvall RC 5-C
	Heraeus Minifuge GL
Mikroinjektionsapparatur	Eppendorf 5242
Mikromanipulator	Leitz
Mikroskop	Leitz, Standard 14
Sofortbildkamera	Polaroid MP-4
Spektralphotometer	LKB Ultospec II
Stereomikroskop	Wild M3
Szintillationszähler	Beckmann LS 1801
Tischzentrifugen	Eppendorf 5415
	Heraeus Biofuge B
Ultrazentrifuge	Beckmann L8-M
UV-Transilluminatoren	Herolab UVT 2020 (254 bzw. 365 nm)

DNA-Sequenzanalysen wurden auf einem VAX-Computer (Digital Equipment, Maynard, USA) des MPI für Biochemie mit Daten und Software der University of Wisconsin Genetics Computer Group, Version 3.3 (Devereux et al., 1984) und der National Biomedical Research Foundation (Washington, USA) durchgeführt.
Ansonsten standen für die Durchführung dieser Arbeit die Einrichtungen des MPI für Biochemie zur Verfügung.

3.1.2. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
Ampicillin	Serva, Heidelberg
ATP	Boehringer, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
DEPC	Serva, Heidelberg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
DTT	Serva, Heidelberg

Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Guanidin-Hydrochlorid	Gibco-BRL, Eggenstein
Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Heringssperma-DNA	Boehringer, Mannheim
LMP-Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
MOPS	Serva, Heidelberg
N,N´-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Polyvinylpyrolidon	Sigma, Deisenhofen
Sarkosyl	Serva, Heidelberg
Sephadex G 100	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
tRNA aus Bäckerhefe	Boehringer, Mannheim
Voltalef-Öl	Lehmann, Hamburg
Xylencyanol FF	Sigma, Deisenhofen

Weitere verwendete Chemikalien waren, soweit erhältlich, von der Qualität p.A. und wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.3. Radioisotope

[α-^{32}P]-dATP	3000 Ci/mmol
[α-^{35}S]-dATP	600 Ci/mmol
[γ-^{32}P]-ATP	5000 Ci/mmol

Sämtliche radioaktiv markierten Nukleotide wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen.

3.1.4. Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Die Vektoren pUC8, 18, 19 (Vieira und Messing, 1982) und pBR322 (Bolivar et al., 1977) sowie das Plasmid pCH110 (Hall et al., 1983) wurde mir freundlicherweise von Dr. J. Altschmied überlassen.
Von der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) wurde DNA des Plasmids pMC1871 (Shapira et al., 1983) bezogen.
Der P-Element-Vektor pW8 (Klemenz et al., 1987) wurde freundlicherweise von Dr. R. Klemenz und das Helfer-P-Element pπ25.7wc (Karess und Rubin, 1984) von S. Richter zur Verfügung gestellt.

Für enzymatische Sequenzanalysen von Subklonen in pUC-Vektoren wurden der "reverse sequencing"- und "sequencing"-Primer von der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

"reverse sequencing"-Primer: CAGGAAACAGCTATGAC
"sequencing"-Primer: GTAAAACGACGGCCAGT

Für die Sequenzanalyse im Bereich der Fusionsstelle zwischen dem ß3-Tubulingen und dem *lacZ*-Gen in den beiden Konstrukten pW/ß3/lac-6,0I und pW/ß3/lac-6,0c wurden Oligonukleotide (zur relativen Position im ß3-Tubulingen siehe Abb. 15) verwendet, die freundlicherweise von Dr. R. Mertz und D. Weigant zur Verfügung gestellt wurden.

Oligo 1: GACTCGAGCTTGAGAAACTC
Oligo 2: CACTCGAGTCGCAGTCGACTCA

Zur Fusion von ß3-Tubulin- und *lacZ*-Gen wurde ein HindIII-Linker von der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

HindIII-Linker: CGAAGCTTCG

3.1.5. Antikörper

Anti-ß-Galactosidase (monoklonaler Antikörper aus Maus) wurde von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen.
Anti-ß3-Tubulin (affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen) wurde mir freundlicherweise von D. Leiss zur Verfügung gestellt.

3.1.6. Enzyme und "Kits"

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
AMV-1 Reverse Transkriptase	Boehringer, Mannheim
DNase I	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Fragment	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
T4-Polynucleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Gibco-BRL, Eggenstein
RNase A	Boehringer, Mannheim
S1-Nuklease	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
"Nicktranslation Kit"	Amersham, Braunschweig
"Sequenase Kit"	USB, Cleveland (USA)
"Vectastain ABC Kit"	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

3.1.7. Puffer und Medien

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

LB-Medium: 1 % Bactotrypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl

LB-Agar: 1 % Bactotrypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
1,5 % Bacto-Agar

aufkochen, auf 60°C abkühlen lassen und in 9,5 cm Petrischalen gießen. Bei Bedarf gibt man vor dem Gießen Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) dazu.
Für LB-Softagar bzw. LB-Softagarose gibt man pro Liter LB-Medium nur 7 g Bacto-Agar bzw. Agarose dazu.

3.1.8. Bakterien und Phagen

Für die Klonierung und Gewinnung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm HB 101 benutzt (Boyer und Roulland-Dussoix, 1969). Als Wirt für die Vermehrung der EMBL4-Phagen diente der *E. coli*-Stamm Q 358 (Karn et al., 1980).
Die Stämme haben folgende Genotypen:

HB 101 F-, *hsd*S20(r_B-, m_B-), *sup*E44, *ara*-14, *gal*K-2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20(str^R), *xyl*-5, *mtl*-1, λ-, *rec*A13

Q 358 *hsd*R_k-, *hsd*M_k+, *sup*E, $\phi 80^r$

Die verwendete genomische Bank (Pirotta et al., 1983) entstand nach partieller Sau3A-Spaltung von DNA aus *Drosophila melanogaster* (Oregon R) und Insertion in die BamHI-Schnittstelle von EMBL4-Phagen (Frischauf et al., 1983). Sie wurde freundlicherweise von Dr. V. Pirotta zur Verfügung gestellt.
EMBL4-Phagen haben folgenden Genotyp:

λ-EMBL4 λ*sbh*Iλ1°, *b*189 < Polylinker (SalI, BamHI, EcoRI), *int*29, *nin*L44, *c*I857, *trp*E, Polylinker (EcoRI, BamHI, SalI) > KH54,*chi*C, *sr*Iλ4°, *nin*5, *sr*Iλ5°

3.1.9. Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm von *Drosophila melanogaster* wurde Oregon R in ständiger Zucht gehalten.
Für P-Element-Transformationen wurde der Stamm $w^1, sn^w/ w^1, sn^w; st/+$ verwendet. Dieser Stamm wurde freundlicherweise von Dr. R. Klemenz zur Verfügung gestellt.
Die Stämme dl^1 (Nüsslein-Volhard, 1979), $Df(2R)twi^{S60}$ (Simpson, 1983) und sna^{IIG05} (Nüsslein-Volhard, Wieschaus und Kluding, unveröffentlicht) wurden freundlicherweise von Dr. C. Nüsslein-Volhard zur Verfügung gestellt.

3.1.10. Verschiedenes

Für den Transfer von Nukleinsäuren wurden "GeneScreen"- bzw. "Colony/PlaqueScreen"-Membranen von der Firma E. I. du Pont de Nemours & Co. (Boston, USA) verwendet.
Fotografiert wurde mit Polaroidfilm 667 (Agarose-Gele), Agfa Ortho 25 professional (Autoradiografien) und Kodak Ektachrom 50 (immunhistochemische Färbungen). Für Autoradiografien wurden Röntgenfilme X-Omat AR5 von der Firma Kodak (Rochester, USA) verwendet.
Zum Dechorionisieren von Embryonen wurde Dan Klorix von der Firma Höhn & Höhn (Haan) verwendet.
Glaskapillaren für die Mikroinjektion kamen von der Firma Clark Electromedical Instruments (Reading, Großbritannien).

3.2. Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden Arbeitsvorschriften nach Maniatis et al. (1982), teilweise modifiziert, verwendet.

3.2.1. *Drosophila*-Zucht

Maisgrießfutter:	10 %	Maisgrieß
	6 %	Zucker
	1,5 %	Trockenhefe
	0,65 %	Agar
	0,24 %	Nipagin
Apfelsaft-Agar:	25 %	Apfelsaft
	1,25 %	Zucker
	2,5 %	Trockenhefe
	40 %	Agar
	0,2 %	Nipagin

Die permanente Zucht von *Drosophila melanogaster* erfolgt bei 25°C und ca. 70 % relativer Luftfeuchte in Plexiglaskästen von ca. 0,2 m^3. Zur Fütterung dienen Petri-Schalen mit Maisgrießfutter (dick mit Hefe bestrichen), die jeden Tag erneuert werden. Zur Aufzucht werden Fliegenflaschen mit Maisgrießfutter mit etwas Hefe bestrichen, für einige Stunden in die Zuchtkästen gestellt, dann mit Schaumstoff-Pfropfen verschloßen und bis zum Schlüpfen der Fliegen bei 25°C gehalten. Zum Absammeln von Embryonen für die RNA-Präparation dienen Petri-Schalen mit Apfelsaft-Agar. Die Embryonen werden unter Wasser mit einem Pinsel von der Platte gelöst, auf einem Nylonnetz gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die RNA-Präparation werden Puppen mit einem Spatel von der Wand gut-bevölkerter Fliegenflaschen abgekratzt, Fliegen mit Ether betäubt und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Zum Absammeln von Embryonen für die Mikroinjektion gibt man 200 - 300 Fliegen nach dem Schlüpfen in eine Fliegenflasche, in die man zuvor mit einer glühenden Nadel feine Löcher gebohrt hat, und stülpt diese auf eine kleine Petrischale mit Apfelsaft-Agar (mit Hefe bestrichen). Wenn nach ca. 3 Tagen die Fliegen mit der Eiablage beginnen kann man Embryonen für die Injektion absammeln. Dazu verwendet man Platten mit durchsichtigem Apfelsaft-Agar (ohne Trockenhefe), auf dem die Embryonen besser erkannt werden und verfährt wie in Abschnitt 3.2.9.2. beschrieben.

3.2.2. Nukleinsäure-Präparationen

3.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.2.2.1.1. Isolierung aus Einzelkolonien

(Holmes und Quigley, 1981; modifiziert nach Wilimzig, 1985)

TELT-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
60 mM EDTA
2,5 M LiCl
0,4 % Triton X-100

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml in H_2O

Zur schnellen Charakterisierung von Plasmid-DNA werden 5 ml LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. 1 ml dieser Kultur wird in einem Eppendorf-Gefäß 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Bakteriensediment dann in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym-Lösung wird gemischt und der Ansatz dann für 1 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach 5 min auf Eis wird für 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wird dann durch Zugabe von 200 µl Ethanol gefällt und nach Zentrifugation (10 min, 14000 Upm) in 50 µl TE-Puffer gelöst. Für eine Restriktionsanalyse werden 5-10 µl eingesetzt. Werden bei der Spaltung kurze DNA-Fragmente erwartet, wird vor der Gelelektrophorese 1µl RNase A-Lösung (10 mg/ml in H_2O; zur Inaktivierung von DNasen 10 min gekocht) zugesetzt.

3.2.2.1.2. Isolierung aus Großkulturen

STET-Puffer: 8 % Saccharose
0,5 % Triton X-100
50 mM Tris/HCl, pH 8,0
50 mM EDTA

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml in H_2O

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml in H_2O

1 Liter LB-Medium wird mit 1 ml einer Übernachtkultur des plasmidhaltigen *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C

unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien werden durch zehnminütiges Zentrifugieren im GS3-Rotor bei 5000 Upm sedimentiert und nach Abgießen des Überstandes in 20 ml STET-Puffer resuspendiert. Nach Überführen in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 2 ml Lysozym-Lösung wird die Suspension in einer Bunsenbrennerflamme kurz aufgeheizt und sofort für 1 min bei 100°C in einem Wasserbad inkubiert. Das zähflüssige Lysat wird für 30 min bei 30000 Upm im Ti50.2-Rotor zentrifugiert. Den Überstand extrahiert man mit 5 ml Phenol/Chloroform (1:1) und fällt die DNA dann mit 0,8 Volumen Isopropanol. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 Upm, Heraeus-Minifuge) wird die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und in 3 ml TE-Puffer gelöst. Nach Lösen von 4,5 g CsCl und Zugabe von 500 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H_2O) wird erneut zentrifugiert (10 min, 5000 Upm, Heraeus-Minifuge). Die klare Lösung wird in ein Beckmann VTI65-Quickseal-Röhrchen überführt und mit H_2O bzw. 50 % CsCl (w/w) aufgefüllt (das gefüllte Röhrchen sollte 9,6 - 9,8 g wiegen). Nach Zuschweißen des Röhrchens erfolgt Zentrifugation im VTI65-Rotor (12 - 16 h, 55000 Upm, 20°C). Unter UV-Licht wird die Bande mit höherer Dichte mit einer Einmalspritze abgezogen und in ein neues Quickseal-Röhrchen überführt. Nach Auffüllen mit 50 % CsCl (w/w) wird erneut im VTI65-Rotor (5 h, 55000 Upm, 20°C) zentrifugiert. Die Plasmidbande wird abgezogen und zum Entfernen von Ethidiumbromid mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert bis die organische Phase keine Färbung mehr aufweist. Zur wässrigen Phase wird dann 2 Volumen H_2O gegeben und die DNA dann durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 10000 Upm im SS34-Rotor bei 4°C wird das Sediment zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 300 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration wird spektralphotometrisch (1 OD_{260} = 50 µg/ml) bestimmt. Die Ausbeuten liegen normalerweise zwischen 1 und 2 mg DNA.

3.2.2.2. Präparation von λ-Phagen-DNA

(Yamamoto et al., 1970; modifiziert nach Maniatis et al., 1982)

PS-Medium:
- 1 % Bactotrypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,5 % NaCl
- 0,2 % $MgCl_2 \times 2H_2O$

SM-Puffer:	0,05 M Tris/HCl, pH 7,5
	0,1 M NaCl
	0,2 % $MgSO_4$
	0,05 % Gelatine
PN-Puffer:	20 % PEG 6000
	2 M NaCl
	in SM-Puffer

Nach Resuspension der λ-Phagen eines Plaques in 1 ml SM-Puffer (siehe Abschnitt 3.2.7.1.) entnimmt man 500 µl dieser Lösung und inkubiert sie mit 100 µl einer gesättigten Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes (Q 358 für die EMBL4-Bank) 10 Minuten bei 37°C. Es werden 4 ml PS-Medium dazugegeben und 9 Stunden bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Dann werden 0,1 ml Chloroform hinzugegeben und weitere 15 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (6000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus-Minifuge) überführt man den klaren Überstand in ein neues Röhrchen. Es werden RNase A und DNase I (2 µg/ml Endkonzentration) dazugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Präzipitieren der Phagen gibt man das gleiche Volumen PN-Puffer hinzu und inkubiert 1 Stunde in Eiswasser. Anschließend wird zentrifugiert (6000 Upm, 30 min, 4°C, Heraeus-Minifuge), der Überstand abgekippt und die sedimentierten Phagen in 0,5 ml SM-Puffer resuspendiert. Zellreste werden durch zweiminütige Zentrifugation bei 8000 Upm in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Phagen nach Zugabe von 5 µl 10 % SDS und 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) durch 15minütige Inkubation bei 68°C lysiert. Danach wird zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, sedimentiert (15 min, Eppendorf-Zentrifuge), mit 70 % und 100 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute liegt bei 5 - 10 µg DNA. Die hier geschilderte Methode eignet sich auch zur Präparation größerer Mengen. Dazu gibt man 25 ml PS-Medium zum Bakterien-Phagen-Gemisch und inkubiert über Nacht bei 37°C. Bei unvollständiger Lyse werden 25 ml vorgewärmtes PS-Medium hinzugefügt und nochmals 3 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Aufarbeitung verfährt man wie oben geschildert, wobei sich die jeweiligen Volumenangaben entsprechend ändern.

3.2.2.3. Präparation von Gesamt-RNA aus *Drosophila*

3.2.2.3.1. Standardverfahren

(Auffray und Rougeon, 1980; LeMeur et al., 1981)

HP-Puffer:	3 M LiCl
	6 M Harnstoff
	10 mM Natriumacetat, pH 5,0
	0,1 % SDS
	0,2 mg/ml Heparin
WP-Puffer:	4 M LiCl
	8 M Harnstoff
SP-Puffer:	50 mM Natriumacetat, pH 5,0
	1 % SDS
Phenol/Chloroform:	1:1 in SP-Puffer gesättigt

5 g gefrorene Embryonen, Puppen oder Fliegen werden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zerrieben. Das feine Pulver wird mit 100 ml HP-Puffer im Motorpotter (Teflonpistill, 1500 Upm, 20 Stöße) homogenisiert. Nach 16 h bei 4°C wird die präzipitierte RNA abzentrifugiert (20 min, 4°C, 12000 Upm, GSA-Rotor). Nach zweimaligem Waschen mit je 20 ml WP-Puffer (Zentrifugation wie oben) wird der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird in 10 ml SP-Puffer gelöst. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol/Chloroform (Phasentrennung: 5 min, 4°C, 5000 Upm, Heraeus-Minifuge) wird der Überstand in Corex-Röhrchen überführt und nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) mit 2,5 Volumen Ethanol bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation im SS34-Rotor (4°C, 10000 Upm, 20 min) wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und die RNA dann in SP-Puffer gelöst. Die Konzentration wird spektralphotometrisch bestimmt (1 OD_{260} = 40 µg/ml). Die durchschnittliche Ausbeute einer Präparation liegt bei ca. 5 mg.

3.2.2.3.2. Mikromethode für injizierte Embryonen

(Chirgwin et al., 1979, modifiziert nach Steller, 1984)

GHCl-Puffer:	7,5 M Guanidin-Hydrochlorid
	25 mM Natriumacetat, pH 7,0
	5 mM DTT
vor Gebrauch zugeben:	0,5 % Sarkosyl
	0,5 % DEPC

Ein Deckgläschen mit ca. 50 Embryonen wird in eine kleine Petri-Schale gelegt und das Voltalef-Öl durch vorsichtiges Spülen in ca. 3-4 ml n-Heptan gelöst. Die durch das Heptan ebenfalls vom Klebstoff abgelösten Embryonen werden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach möglichst vollständigen Absaugen des über den Embryonen stehenden Heptans werden 50 µl GHCl-Puffer dazugegeben und mit einem Teflonpistill gründlich homogenisiert. Das Homogenisat wird dann mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 5 min, Eppendorfzentrifuge) wird die wässrige (obere) Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und die RNA durch Zugabe von 1 µl 1 M Essigsäure und 25 µl Ethanol für 3 h bei -20°C gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (14000 Upm, Eppendorfzentrifuge) und Absaugen des Überstandes wird die sedimentierte RNA in 50 µl GHCl-Puffer gelöst. Nach erneutem Fällen und Abzentrifugieren (obige Bedingungen) wird die RNA mit 100 % Ethanol gewaschen. Für eine S1-Analyse wird sie direkt in Hybridisierungspuffer gelöst. Die durchschnittliche Ausbeute liegt bei 1 - 2 µg RNA.

3.2.3. Gelelektrophoresen

3.2.3.1 DNA in Agarose-Gelen

10 x TBE-Puffer:	0,9 M Tris
	0,9 M Borsäure
	20 mM EDTA
50 x TAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat, pH 7,7
	0,1 M EDTA
10 x Auftragspuffer:	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol
	40 % Glyzerin

0,5 - 2 % Agarose, je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, werden in 1 x TAE oder 1 x TBE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in eine horizontale Gelkammer (Höhe ca. 0,5 cm) gegossen. Nach dem Erstarren wird die Gelkammer mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt die Proben in 1 x Auftragspuffer aufgetragen und die DNA dann elektrophoretisch aufgetrennt (ca. 10 V/cm). Nach dem Lauf wird die DNA im Gel mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in Laufpuffer angefärbt.

3.2.3.2. RNA in denaturierenden Agarose-Gelen

(Lehrach et al., 1977; Goldberg, 1980)

10 x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS, pH 7,0
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
Probenpuffer:	50 % Formamid
	2,2 M Formaldehyd
	1 x MOPS-Puffer

Für ein 1,2 %iges Agarose-Gel der Größe 20 x 20 cm werden 3,6 g Agarose in 216 ml H_2O aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C werden 30 ml 10 x MOPS-Puffer und 54 ml Formaldehyd-Lösung zugegeben, gemischt und das Gel dann gegossen.
Die gefällte RNA und der Größenstandard werden abzentrifugiert (20 min, 14000 Upm, Eppendorfzentrifuge), zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 20 µl Probenpuffer gelöst. Die Proben werden 5 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl einer konzentrierten Bromphenolblau-Lösung werden die Proben aufgetragen. Das Gel läuft 16 h bei 50 Volt.

3.2.3.3. DNA in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Silikonisierungs-Lösung:	2 % Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan
Acrylamid-Lösung:	38 % Acrylamid
	2 % N,N´-Methylenbisacrylamid
10 x TBE-Puffer:	0,9 M Tris
	0,9 M Borsäure
	20 mM EDTA

Auftragspuffer:	90 % Formamid in 1 x TBE
	0,02 % Bromphenolblau
	0,02 % Xylencyanol
Fixier-Lösung	10 % Essigsäure
	5 % Methanol

Es wurden 0,4 oder 0,2 mm dicke Vertikal-Gele verwendet. Die Glasplatte mit dem Ausschnitt wird silikonisiert, um sie später problemlos vom Gel abheben zu können. Dazu wird sie mit Silikonisierungs-Lösung eingerieben und dann mit H_2O und Ethanol gewaschen.
Die Lösung zum Gießen des Gels (100 ml) enthält 50 % Harnstoff, 1 x TBE und Acrylamid-Lösung (je nach gewünschter Konzentration). Vor dem Gießen wird das Gemisch filtriert, an der Wasserstrahlpumpe entgast und die Polymerisation durch Zufügen von 30 µl TEMED und 150 µl 40 % APS gestartet.
Der Elektrophorese geht ein Vorlauf von 1 h bei ca. 30 Watt in 1 x TBE voraus. Die getrockneten Proben werden in Auftragspuffer aufgenommen, 2 min bei 90°C inkubiert und dann sofort in Eiswasser gestellt. Die Geltaschen werden gründlich ausgespült und die Proben mit einer ausgezogenen Glaskapillare aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 Watt, wobei zur besseren Wärmeverteilung eine 1,5 mm starke Aluminiumplatte vor dem Gel befestigt wird.
Nach Beendigung der Elektrophorese kann das Gel mit Haushalts-Folie bedeckt werden und die Autoradiografie durch direktes Auflegen eines Films erfolgen (zur Verhinderung von Diffusion bei -70°C).
Ein schärferes Bandenmuster erhält man jedoch nach vorherigem Trocknen. Dazu wird das Gel zunächst für 10 min auf der Glasplatte in die Fixierlösung gelegt, dann auf Whatman-Papier transferiert und mit Haushalts-Folie bedeckt. Nach 1 h bei 80°C im Geltrockner erfolgt die Autoradiografie (bei der Verwendung von ^{35}S ohne Verstärkerfolie bei Raumtemperatur, bei ^{32}P mit Verstärkerfolie bei -70°C).

3.2.4. Subklonierungen

3.2.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

10 x Niedrig-Salz-Puffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	$MgCl_2$
	10 mM	DTT
10 x Mittel-Salz-Puffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	500 mM	NaCl
	100 mM	$MgCl_2$
	10 mM	DTT
10 x Hoch-Salz-Puffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1000 mM	NaCl
	100 mM	$MgCl_2$
	10 mM	DTT
10 x Sma-Puffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	200 mM	KCl
	100 mM	$MgCl_2$
	10 mM	DTT

1 µg DNA wird mit 1 - 2 U des Restriktionsenzyms in 20 µl des entsprechenden Puffers für 2 - 3 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

3.2.4.2. Präparation von Restriktionsfragmenten

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wird in einem LMP-Agarose-Gel in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt (Gele mit weniger als 1 % Agarose bei 4°C). Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wird die Bande unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Gefäß auf 0,5 % Agarose verdünnt. Dann wird die Agarose unter häufigem Vortexen bei 65°C geschmolzen und durch zweimalige Phenol-Extraktion entfernt. Nach dreimaliger Ether-Extraktion zur Entfernung des Phenols wird auf 0,3 M NaOAc eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol gefällt.
Soll die DNA für eine Ligation verwendet werden, kann man die Agarose auch auf 0,2 % verdünnen, schmelzen und dann direkt zur Ligation einsetzen.

3.2.4.3. Auffüllen überhängender 5´-Enden mit Klenow-Fragment

Zu 0,5 - 1 µg DNA in 30 µl Niedrig- bzw. Mittel-Salz-Puffer (siehe Abschnitt 3.2.4.1.) gibt man je 1 µl der benötigten dNTP-Lösungen (0,5 mM) und 0,5 U Klenow-Fragment. Man inkubiert 10 Minuten bei Raumtemperatur und stoppt die Reaktion durch Phenol-Extraktion. Nach zweimaliger Extraktion mit Ether wird auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und die DNA mit 2 Volumen Ethanol gefällt.

3.2.4.4. Ligation von DNA

3.2.4.4.1. Ligation von Restriktionsfragmenten mit synthetischer Linker-DNA

10 x Kinase-Ligase-Puffer:
660 mM Tris/HCl, pH 7,5
100 mM $MgCl_2$
100 mM ß-Mercaptoethanol

250 pmol Linker-DNA werden mit 50 µCi [γ-^{32}P]-ATP (5000 Ci/mmol) in 10 µl Kinase-Ligase-Puffer mit 2 U T4-Polynukleotidkinase 30 min bei 37°C inkubiert. Dann werden 1 µl einer 1 mM ATP-Lösung und erneut 2 U T4-Polynukleotidkinase hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei 37°C inaktiviert man die Polynukleotidkinase durch fünfminütiges Erhitzen auf 70°C.
1 pmol 5´-Enden des Restriktionsfragments mit glatten Enden (5´-überhängende Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, siehe Abschnitt 3.2.4.3.) und 50 pmol 5´-Enden der radioaktiv markierten Linker-DNA werden nach Zugabe von 0,5 µl 10 mM ATP und 5 U T4-DNA-Ligase in 10 µl Kinase-Ligase-Puffer für mindestens 6 Stunden bei 15°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Ligation (erkennbar an einer "Leiter" der aneinanderligierten Linker-DNA) wird durch Auftrennung eines Aliquots in einem denaturierenden 10 % Polyacrylamid-Gel und anschließende Autoradiografie überprüft.
Der Ligationsansatz wird dann mit 200 U des (die Linker-Sequenz erkennenden) Restriktionsenzyms in 75 µl Restriktionspuffer für 4 Stunden bei der geeigneten Temperatur inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung kann ebenfalls durch Auftrennung eines Aliquots in einem denaturierenden 10 % Polyacrylamid-Gel und Autoradiografie überprüft werden (ist die Spaltung unvollständig, isoliert man die gewünschte Bande über ein LMP-Agarose-Gel und wiederholt die Inkubation mit dem

Restriktionsenzym). Nach Extraktion mit 75 µl Phenol und 200 µl Ether fällt man die DNA durch Zugabe von 35 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 350 µl Ethanol. Man wäscht zweimal mit 70 % Ethanol und löst die DNA in TE-Puffer.

3.2.4.4.2. Ligation von Restriktionsfragmenten mit Vektor-DNA

10 x Ligase-Puffer:	200 mM Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM $MgCl_2$
	100 mM DTT
	6 mM ATP

Die zu ligierende DNA wird mit der äquimolaren Menge an linearisierter Vektor-DNA (ca. 0,5 µg) in 30 µl Ligase-Puffer mit 0,1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Besitzt die Vektor-DNA an beiden Seiten kompatible Enden, so sollten die 5´-Enden zuvor dephosphoryliert werden (siehe Abschnitt 3.2.5.2.1.)

3.2.4.5. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* HB101

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* HB101 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Wenn eine OD_{650} von 0,2 erreicht ist, werden die Zellen abzentrifugiert (5000 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Minifuge) und in 40 ml kalter $CaCl_2$-Lösung (0,1 M) vorsichtig resuspendiert. Nach 20 min auf Eis werden die Zellen erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert und in 1 ml kalter $CaCl_2$-Lösung (0,1 M) resuspendiert. Bis zur Transformation läßt man die Zellen in Eis stehen.

3.2.4.6. Transformation von *E. coli* HB101

Zur Transformation werden das Ligationsgemisch (oder gereinigte Plasmid-DNA) und 100 µl kompetente Zellen gemischt. Es wird 10 min auf Eis und 5 min bei 37°C inkubiert. Dann gibt man 2 ml LB-Medium dazu und läßt die Zellen 1 h bei 37°C schütteln. 100 µl dieser Kultur und der durch Zentrifugation sedimentierte und in 100 µl LB-Medium aufgenommene Rest werden auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5. Radioaktive Markierung von DNA

3.2.5.1. Nicktranslation

(Rigby et al., 1977; Vorschrift zum "Nicktranslation Kit" von Amersham)

Zu ca. 0,1 µg DNA in 2 µl H_2O gibt man 2 µl Lösung 1 (je 100 µM dCTP, dGTP und dTTP in 5 x Nicktranslationspuffer) und 1 µl Lösung 2 (0,5 U DNA-Polymerase und 10 pg DNase I) des "Nicktranslation Kit", sowie 5 µl [α-^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol). Man inkubiert den Reaktionsansatz 1 Stunde bei 15°C und stoppt die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und zehnminütiges Erhitzen auf 65°C. Um die radioaktiv markierte DNA von nicht inkorporierten Desoxynukleotiden zu trennen pipettiert man den Ansatz auf eine mit TE-Puffer äquilibrierte Sephadex G 100-Säule (ca. 2 ml in einer Pasteurpipette) und eluiert mit TE-Puffer. Man sammelt Fraktionen von ca. 0,3 ml und bestimmt ihre Cerenkov-Zählrate. Die Fraktionen des ersten peaks werden vereinigt und bei -20°C aufbewahrt. Die spezifische Aktivität der DNA liegt bei ca. 10^8 cpm/µg.

3.2.5.2. 5´ Endmarkierung mit Polynukleotidkinase

CIP-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
10 x STE:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 M NaCl 10 mM EDTA
10 x PNK-Puffer: (überhängende Enden)	0,5 M Tris/HCl, pH 7,6 0,1 M $MgCl_2$ 50 mM DTT 1 mM EDTA
Puffer I:	0,2 M Tris/HCl, pH 9,5 1 mM Spermidin 0,1 mM EDTA
10 x PNK-Puffer: (glatte Enden)	0,5 M Tris/HCl, pH 9,5 0,1 M $MgCl_2$ 50 mM DTT 50 % Glyzerin

3.2.5.2.1. Dephosphorylierung

Die DNA wird in 20 µl CIP-Puffer aufgenommen. Dann werden pro pmol 5´-Ende 0,02 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm zugesetzt. Bei überhängenden Enden wird 60 min bei 37°C inkubiert. Bei glatten Enden erfolgt die Dephosphorylierung für 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C. Nach Zufügen weiterer alkalischer Phosphatase wird erneut für je 15 min bei 37°C und 56°C inkubiert. Man stoppt die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 10 x STE, 1 µl einer 20 % SDS-Lösung, 25 µl H_2O und zehnminütiges Erhitzen auf 65°C. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol und Ether wird 1/10 Volumen 5 M NaCl zugegeben und die DNA mit 2 Volumen Ethanol präzipitiert.

3.2.5.2.2. Kinase-Reaktion

Überhängende Enden:
Die dephosphorylierte DNA (1 - 2 pmol) wird mit 100 µCi [γ-^{32}P]-ATP in 15 µl PNK-Puffer aufgenommen. Man inkubiert mit 10 U T4-Polynukleotidkinase 30 min bei 37°C. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und fünfminütige Inkubation bei 65°C. Zur Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide wird die DNA mit 0,8 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt. Nach 5 min in flüssigem Stickstoff wird die DNA abzentrifugiert und zweimal mit 0,5 M Ammoniumacetat in 75 % Ethanol gewaschen.

Glatte Enden:
Die DNA wird in 13 µl Puffer I aufgenommen und die DNA-Enden dann durch Erhitzen auf 70°C aufgeschmolzen. Nach Abschrecken in Eiswasser werden 1,5 µl 10 x PNK-Puffer, 100 µCi [γ-^{32}P]-ATP und 20 U T4-Polynukleotidkinase zugegeben. Inkubation und Stoppen der Reaktion, sowie Fällung der DNA erfolgt analog zur Markierung überhängender Enden.

3.2.6. Sequenzierung von DNA

3.2.6.1. Basenspezifische chemische Spaltung

(Maxam und Gilbert, 1977, 1980)

Pip-For:	4 %	Ameisensäure mit Piperidin auf pH 2,0 eingestellt
DMS-Puffer:	50 mM	Natriumcacodylat
	1 mM	EDTA
DMS-Stop:	1,5 M	Natriumacetat, pH 7,0
	1 M	ß-Mercaptoethanol
Hz-Stop:	300 mM	Natriumacetat, pH 7,0
	0,1 mM	EDTA
Alkali:	1,5 M	NaOH
	1 mM	EDTA
Alk-Stop:	0,66 M	Essigsäure
	0,1 M	Natriumacetat
"Carrier"-DNA:	10 mg/ml	Heringssperma-DNA in TE-Puffer (10 x 1 min beschallt)

Das zu sequenzierende DNA-Fragment wird am 5´-Ende mit ^{32}P markiert und mit einem geeigncten Restriktionsenzym nachgeschnitten, damit die Markierung an einer Seite des Fragments verlorengeht. Das einseitig markierte Fragment wird dann über ein LMP-Agarose-Gel isoliert. Gelöst wird ein DNA-Fragment von 0,5 kb Länge in einer Konzentration von ca. 10000 cpm/µl (in H_2O).

Die G+A-Reaktion:
10 µl markierte DNA, 10 µl H_2O und 1 µl "Carrier"-DNA werden mit 2 µl Pip-For versetzt und 100 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsansatz wird nach Einfrieren auf Trockeneis lyophilisiert. Zur vollständigen Entfernung von Piperidin und Ameisensäure nimmt man in 20 µl H_2O auf und lyophilisiert erneut.

Die G-Reaktion:
5 µl markierte DNA, 200 µl DMS-Puffer und 1 µl "Carrier"-DNA werden mit 1 µl Dimethylsulfat 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl DMS-Stop und Fällung mit 750 µl Ethanol unterbrochen. Nach 15 min auf Trockeneis wird die DNA durch 15-minütige Zentrifugation pelletiert, in 250 µl 0,3 M Natriumacetat gelöst und mit 750 µl Ethanol wiederum gefällt. Nach erneutem Lösen und Fällen wird die DNA mit 1 ml Ethanol gewaschen und getrocknet.
Dimethylsulfat-Abfälle entsorgt man in 5 M NaOH.

Die T+C-Reaktion:
10 µl markierte DNA, 10 µl H_2O und 1 µl "Carrier"-DNA werden mit 30 µl Hydrazin 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Hz-Stop wird die DNA 15 min mit 750 µl Ethanol auf Trockeneis gefällt. Die weitere Reinigung ist mit der bei der G-Reaktion beschriebenen identisch.
Hydrazin-Abfälle werden in 3 M $FeCl_3$-Lösung entsorgt.

Die C-Reaktion
5 µl markierte DNA, 1 µl "Carrier"-DNA und 15 µl 5 M NaCl werden wie bei der T+C-Reaktion behandelt (die Anwesenheit von NaCl ändert die Spezifität der Reaktion).

Die A>C-Reaktion
8 µl markierte DNA und 1 µl "Carrier"-DNA werden mit 40 µl Alkali versetzt und 6 min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen stoppt man die Reaktion durch Hinzufügen von 225 µl Alk-Stop, mischt und fällt die DNA mit 1 ml Ethanol auf Trockeneis. Die weitere Behandlung entspricht der G-Reaktion.

Die Spaltungsreaktion
Die DNA-Pellets aus den fünf Reaktionen werden in 100 µl 1M Piperidin aufgenommen und 30 min bei 90 °C inkubiert. Nach dem Einfrieren auf Trockeneis wird der Reaktionsansatz lyophilisiert. Um Spuren von Piperidin zu entfernen wird noch zweimal in 10 µl H_2O aufgenommen und wiederum lyophilisiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgt in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel.

3.2.6.2. Enzymatische Sequenzierung von Plasmid-DNA

(Sanger et al., 1977; Chen und Seeburg, 1985; Anleitung zum "Sequenase Kit" von USB)

Denaturierungs-Puffer:	0,2 M NaOH 0,2 mM EDTA
5 x Sequenzier-Puffer:	200 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM $MgCl_2$ 250 mM NaCl
dNTP-Lösung:	7,5 µM dCTP 7,5 µM dGTP 7,5 µM dTTP
ddNTP-Terminations-Lösungen	80 µM dATP 80 µM dCTP 80 µM dGTP 80 µM dTTP 8 µM jeweiliges ddNTP

1 - 2 pmol Plasmid-DNA werden in 20 µl Denaturierungs-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat und 45 µl Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 70 % und 100 % Ethanol wird die DNA getrocknet und zusammen mit 2,5 pmol Sequenzier-Primer in einem Volumen von 10 µl Sequenzier-Puffer aufgenommen. Dann inkubiert man 2 min bei 70°C und läßt die DNA langsam auf Raumtemperatur abkühlen. In der Zwischenzeit werden Eppendorf-Gefäße mit je 2,5 µl der ddNTP-Terminations-Lösungen vorbereitet. Zum abgekühlten Hybridisierungsansatz gibt man 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl dNTP-Lösung (1:5 mit H_2O verdünnt), 1 µl [α-^{35}S]dATP (10 µCi) und 2 µl "Sequenase" (1:8 mit TE verdünnt). Nach 5 min bei Raumtemperatur gibt man je 3,5 µl zu den auf 42 °C vorgewärmten ddNTP-Terminations-Lösungen. Nach weiteren 5 min bei 42 °C werden 4 µl Formamid-Auftragspuffer hinzugegeben. Die Reaktionsprodukte werden nach zweiminütigem Erhitzen auf 90 °C auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

3.2.7. Transfer und Detektion von Nukleinsäuren

3.2.7.1. "Screening" einer λ-Bank

(Grunstein und Hogness, 1975; Benton und Davis, 1977)

SM-Puffer:	0,05 M Tris/HCl, pH 7,5
	0,1 M NaCl
	0,2 % $MgSO_4$
	0,05 % Gelatine
Denaturierungs-Lösung:	0,5 N NaOH
Neutralisierungs-Lösung:	1 M Tris/HCl, pH7,5
Hybridisierungs-Lösung:	1 M NaCl
	1 % SDS
	100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
20 x SSC:	3 M NaCl
	0,3 M Na-Citrat

Zunächst wird der Titer der Genbank bestimmt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe in SM-Puffer hergestellt. Je 20 µl einer 10^{-4}-, 10^{-6}- und 10^{-8}-Verdünnung werden mit 100 µl Indikatorbakterien (*E. coli* Q358 für die verwendete EMBL4-Genbank) für 10 min bei 37°C inkubiert. Dann werden 3 ml aufgekochter und auf 42°C abgekühlter LB-Soft-Agar zugegeben und nach Mischen auf LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wird die Anzahl der Plaques auf den Platten bestimmt und daraus der Titer der Bank berechnet.
Zum Ausplattieren der Bank infiziert man je 300 µl einer gesättigten Kultur von *E. coli* Q358 mit ca.10^4 PFU. Man inkubiert für 10 Minuten bei 37°C, gibt 8 ml aufgekochten und auf 42°C abgekühlten LB-Soft-Agarose hinzu und plattiert auf LB-Platten (Durchmesser 15 cm) aus. Nach 8 - 10 Stunden bei 37°C (die Plaques sollten die Größe eines Stecknadelkopfes haben) lagert man die Platten für einige Stunden bei 4°C. Dann legt man "Colony/PlaqueScreen-Filter" (Durchmesser 13,7 cm, DuPont NEF-978A) mit der konvexen Seite auf die abgekühlten Agar-Platten. Durch assymetrische Einstiche mit einer in Wäschetinte getauchten Nadel markiert man die Lage der Filter auf den Platten. Nach 2 - 3 Minuten zieht man den Filter mit einer Pinzette von der Platte ab und legt ihn umgekehrt 2 Minuten auf mit Denaturierungs-Lösung getränktes Whatmann 3MM-Papier (bei Bedarf werden in der

Zwischenzeit Duplikat-Filter gezogen). Dann kommt der Filter kurz auf trockenes und dann erneut 2 Minuten auf mit 0,5 N NaOH getränktes Whatmann 3MM-Papier. Man legt den Filter wiederum kurz auf Whatmann 3MM-Papier und neutralisiert dann wie oben 2 mal 2 Minuten mit 1 M Tris/HCl (pH 7,5), wobei der Filter nach jedem Schritt kurz auf Whatmann 3MM-Papier gelegt wird.
Die getrockneten Filter werden zur Vorhybridisierung in 100 - 200 ml Hybridisierungs-Lösung gegeben und für mindestens 6 Stunden unter Schütteln im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Die durch Nicktranslation markierte Probe (Abschnitt 3.2.5.1.) wird durch Erhitzen auf 90°C denaturiert, in Eiswasser abgekühlt und dann in ein möglichst geringes Volumen Hybridisierungs-Lösung (je nach Gefäß 50 - 100 ml für 20 Filter) gegeben. Die Hybridisierung erfolgt unter Schütteln im 65°C-Wasserbad über Nacht.
Man wäscht die Filter 2 mal 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur, 2 mal 30 min in 2 x SSC mit 1 % SDS bei 65°C und 2 mal 30 min in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur. Die getrockneten Filter werden auf eine feste Unterlage aufgeklebt und mit Haushaltsfolie bedeckt. Autoradiografie erfolgt bei -70°C mit Verstärkerfolien.
Nach der Autoradiografie überträgt man die Markierungen der Filter auf den Röntgenfilm. Die Markierungen auf dem Röntgenfilm werden dann mit denen der Agar-Platten zur Deckung gebracht. Bereiche der Soft-Agarose, unter denen eine Hybridisierung zu erkennen ist, werden mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 1 ml SM-Puffer überführt. Nach Resuspension der Phagen durch einstündiges Schütteln bei Raumtemperatur stellt man eine 10^{-2}-Verdünnung in SM-Puffer her und infiziert je 100 µl einer gesättigten Kultur von *E. coli* Q358 mit 10 und 100 µl dieser Verdünnung. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37°C werden 3 ml 42°C warmer Soft-Agarose dazugegeben und auf LB-Platten (9,4 cm Durchmesser) ausplattiert. Dann wird über Nacht bei 37°C inkubiert und das "Screening" mit einer der beiden Platten wiederholt. Dazu wählt man diejenige aus, auf der zwischen 50 und 200 Plaques zu sehen sind. Diesmal verwendet man "Colony/PlaqueScreen"-Filter mit 8,2 cm Durchmesser (Du Pont, NEF-978), sticht positive Plaques mit dem schmalen Ende einer Pasteurpipette aus und resuspendiert die Phagen in 1 ml SM-Puffer mit einem Tropfen Chloroform.

3.2.7.2 Transfer und Detektion von RNA

(Lehrach et al., 1977; Goldberg 1980)

Transfer-Puffer:	25 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 6,5
100 x Denhardt:	2 % Ficoll 400 2 % Polyvinyl-Pyrrolidon 2 % BSA
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
Vorhybridisierungs-Lösung:	50 % Formamid 2 x Denhardt 5 x SSC 1 % SDS 0,1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
Hybridisierungs-Lösung:	50 % Formamid 1 x Denhardt 5 x SSC 1 % SDS 0,1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

Das Agarose-Gel wird auf Whatmann 3MM-Filterpapier gelegt, das mit Tranfer-Puffer befeuchtet wurde und in ein Reservoir dieses Puffers reicht. Ein "GeneScreen"-Filter wird auf die Größe des Gels zugeschnitten, in Transfer-Puffer äquilibriert und auf das Gel gelegt. Darauf schichtet man weitere mit Transfer-Puffer befeuchtete Whatmann 3MM-Filterpapiere und reichlich trockene Papierhandtücher. Dann wird eine Glasplatte aufgelegt und mit einem Gewicht beschwert. Nach Transfer über Nacht wird die Membran kurz mit Transfer-Puffer abgespült, dann einige Minuten bei Raumtemperatur und 2 h bei 80 - 100°C getrocknet.

Vor der Hybridisierung wird der Filter über Nacht bei 42°C unter Schütteln im Wasserbad vorhybridisiert. Die durch Nicktranslation markierte Probe (Abschnitt 3.2.5.1.) wird durch Erhitzen auf 90°C denaturiert, in Eiswasser abgekühlt und dann in ein möglichst geringes Volumen Hybridisierungs-Puffer (10 - 20 ml) gegeben. Hybridisierung erfolgt ebenfalls bei 42°C für mindestens 16 Stunden. Danach wird der Filter 2 mal 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur, 2 mal 30 min in 2 x SSC mit 1 % SDS bei 65°C, sowie 2 mal 30 min mit 0,1 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen.

Nach Einschweißen in Plastikfolie erfolgt Autoradiographie mit Verstärkerfolie bei -70°C.

3.2.8. Kartierung von Exons an RNA

3.2.8.1. S1-Nuklease-Kartierung

(Berk und Sharp, 1977; Weaver und Weissmann, 1979)

Hybridisierungs-Puffer:	80 % Formamid
	40 mM Pipes, pH 6,4
	400 mM NaCl
	1 mM EDTA
S1-Puffer:	30 mM Natriumacetat, pH 4,5
	3 mM $ZnSO_4$
	300 mM NaCl
	10 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

10 - 20 µg Gesamt-RNA bzw. die Gesamt-RNA aus 50 Embryonen (1 - 2 µg) werden mit 30000 - 50000 cpm endmarkierter Probe in 20 µl Hybridisierungs-Puffer gelöst. Nach dem Denaturieren (90°C, 5 min) wird der Hybridisierungsansatz sofort in ein 45°C-Wasserbad gestellt. Nach Hybridisierung über Nacht werden die Ansätze in Eiswasser gekühlt und mit 200 µl eiskaltem S1-Puffer (mit 200 - 1000 U S1-Nuklease) versetzt. Der Verdau erfolgt 3 Stunden bei 15 - 25°C. Dann extrahiert man mit Phenol/Chloroform (1:1), gibt 10 µg tRNA hinzu und fällt mit 2,5 Volumen Ethanol. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen wird das Pellet in 5 µl Formamid-Auftragspuffer gelöst und die Reaktionsprodukte nach Denaturieren auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert.

3.2.8.2. "Primer Extension"-Analyse

(Ghosh et al., 1980; Büscher et al., 1985)

10 x RT-Puffer	o,5 M Tris/HCl, pH 8,2
	1 M NaCl
	60 mM $MgCl_2$
	100 mM DTT

10 µg Gesamt-RNA, 10 - 100 fmol Primer und 50 µCi [α-^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol) werden in 10 µl DEPC-behandeltem H_2O und 1 µl

(27 U) RNasin gelöst. Dann gibt man 2 µl 10 x RT-Puffer, je 2 µl 2 mM dNTP-Lösungen (dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 µl 2 mM dATP hinzu. Nach Denaturieren (80°C, 2 min) wird der Ansatz sofort in ein 42 bis 45°C-Wasserbad gestellt. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von 7,5 U Reverser-Transkriptase gestartet. Nach 1 Stunde werden 10 µg tRNA hinzugegeben, mit DEPC-behandeltem H_2O auf 50 µl aufgefüllt und mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Dann stellt man auf 0,3 M Natriumacetat ein und fällt mit 2 Volumen Ethanol. Die Reaktionsprodukte werden auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Autoradiografie sichtbar gemacht.

3.2.9. Mikroinjektion von *Drosophila*-Embryonen

(Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982; Steller, 1984; Nüsslein-Volhard, persönliche Mitteilung)

3.2.9.1. Vorbehandlung der DNA

Injektions-Puffer: 0,1 mM Na_2HPO_4/NaH_2P0_4, pH 7,4
5 mM KCl

Die für die Injektion bestimmte Plasmid-DNA wird in 200 µl TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml, zur Inaktivierung von DNase 10 min auf 100°C erhitzt) inkubiert man 1 Stunde bei 37°C. Dann werden 5 µl einer Proteinase K-Lösung (2 mg/ml) zugegeben und nochmals 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaliger Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) und n-Butanol stellt man auf 0,3 M Natriumacetat ein und fällt die DNA mit dem doppelten Volumen Ethanol. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wird das Pellet getrocknet und in Injektions-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wird spektralphotometrisch bestimmt und mit Injektions-Puffer auf 0,5 mg/ml eingestellt. Für die P-Element-Transformation wurde zusätzlich eine Mischung der pW/ß3/lac-Konstrukte und pπ25.7wc (Karess und Rubin, 1984) hergestellt (300 µg/ml bzw. 50 µg/ml in Injektionspuffer). Die Lösungen werden aliquotiert und bis zur Injektion bei -20°C aufbewahrt.

3.2.9.2. Vorbereiten der Embryonen für die Injektion

Man hält 200 - 300 Fliegen (Oregon R für Experimente zur transienten Expression; w^1, sn^w/w^1, sn^w; $st/+$ fürTransformations-experimente mit pW-Vektoren) nach dem Schlüpfen mehrere Tage bei Raumtemperatur auf mit Hefe bestrichenen Apfelsaftagar-

Platten (die Platten sollten mindestens einmal pro Tag erneuert werden). Vor der Injektion werden die während der ersten drei Stunden gelegten Eier verworfen, um gute Synchronisierung der Embryonen zu erreichen. Für die Injektion bestimmte Embryonen werden in Intervallen von etwa 30 min gesammelt. Die Eier werden mit einem Pinsel vorsichtig in ein feinmaschiges Metallsieb überführt, mit H_2O gewaschen und dann durch ca. zweiminütiges Eintauchen in eine Natrium-Hypochlorit-Lösung (Dan Klorix, 1:1 mit H_2O verdünnt) dechorionisiert. Danach werden die Embryonen mit H_2O gründlich gewaschen und mit saugfähigem Papier von überschüssigem H_2O befreit. Man überführt die Embryonen mit einem Pinsel auf ein rechteckiges Apfelsaftagar-Blöckchen und richtet sie mit einer Präpariernadel in einer Reihe aus (parallel zur Längsachse der Embryonen, mit dem anterioren Ende nach rechts). Die Embryonen werden dann auf ein mit Klebstoff (in 10 ml Heptan gelöster Klebstoff von 10 cm Tesa-Packband) bestrichenes Deckgläschen überführt, indem dieses von oben unter leichtem Druck auf die Embryonen geführt wird. Dabei sollten die posterioren Enden der Embryonen ca. eine Embryolänge vom Rand des Deckgläschens zu liegen kommen. Die auf dem Deckgläschen klebenden Embryonen werden dann, je nach Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur, 7 - 15 min in einem Exsikkator über Trockenmittel (Blaugel) gehalten, um den internen Druck in den Embryonen zu verringern. Danach werden die Embryonen sofort mit Voltalef-Öl (10 S) bedeckt und das Deckgläschen auf einen Objektträger gelegt.

3.2.9.3. Injektion

Glaskapillaren mit Filament werden mit einem Kapillarenziehgerät ausgezogen und bis zur Injektion staubfrei gelagert. Die vorbereitete DNA-Lösung wird zentrifugiert (14000 Upm, 5 min, Eppendorfzentrifuge) um Staubpartikel, die die Kapillare verstopfen könnten, zu sedimentieren. Man entnimmt 1 µl mit einer in der Bunsenbrennerflamme ausgezogenen Glaskapillare und pipettiert die DNA-Lösung vom hinteren Ende in die Injektionskapillare. Die Kapillare wird in den, mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur verbundenen, Halter eingespannt und dieser dann am Mikromanipulator befestigt. Der vorderste Teil der Kapillare wird unter mikroskopischer Kontrolle am Rand eines Deckgläschens abgebrochen (der Durchmesser im Bereich der Öffnung sollte 1 - 5 µm betragen). Man bringt nun die Spitze der Kapillare in das Voltalef-Öl, das die Embryonen auf dem vorbereiteten Deckgläschen bedeckt. Der Injektionsdruck wird so eingestellt, daß nur nach Einführen der Kapillare in den Embryo langsam DNA-Lösung ausströmt, nicht jedoch in die hydrophobe

Ölphase. Injiziert werden die Embryonen durch kurzes Einführen der Nadel vom posterioren Ende. Man injiziert soviel DNA-Lösung bis der durch das Trocknen verursachte Flüssigkeitsverlust ausgeglichen ist, möglichst ohne Austritt von Ooplasma. In Experimenten zur transienten Expression wird auf eine möglichst gleichförmige Verteilung der DNA-Lösung im Embryo geachtet. Hierzu wird die Nadel weit in Richtung Kopfregion eingeführt und langsam zurückgezogen. Für Transformationsexperimente wird hingegen in die Region des posterioren Pols injiziert. Embryonen bei denen die Polzellen bereits vorhanden sind (älter als 90 min) werden mit einer Präpariernadel entfernt.

3.2.9.4. Nachbehandlung von injizierten Embryonen

Nach der Injektion überführt man das Deckgläschen in eine Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier, wobei man darauf achten sollte, daß das Voltalef-Öl nicht verläuft, da die Embryonen ansonsten leicht vertrocknen.
Die weitere Entwicklung bis zum gewünschten Entwicklungsstadium erfolgt bei 25°C. In Experimenten zur transienten Expression werden die Embryonen nach Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums von dem Deckgläschen abgelöst und Gesamt-RNA präpariert (siehe Abschnitt 3.2.2.3.2.). Nach Injektion von P-Element-Konstrukten werden die nach einem Tag ins Öl geschlüpften Larven mit einer Präpariernadel in kleine Zuchtflaschen mit Standardfutter überführt (ca. 10 Larven pro Flasche). Die hieraus geschlüpften Fliegen werden vereinzelt und mit den geeigneten Partnern des weissäugigen Ausgangsstammes (w^1, sn^w/w^1, sn^w; $st/+$) gekreuzt. Transformierte Nachkommen (erkenntlich an orange- bzw. rotfarbigen Augen) werden in Einzelpaar-Kreuzungen mit dem Ausgangsstamm rückgekreuzt. Orange- bzw. rotäugige Nachkommen aus diesen Kreuzungen werden solange mit dem Ausgangsstamm rückgekreuzt, bis die Aufspaltung der Nachkommenschaft auf das Vorhandensein nur eines Integrats im Genom hinweist. Dann werden heterozygot transformierte Geschwister untereinander gekreuzt. Homozygot transformierte Nachkommen aus einer solchen Kreuzung, in der Regel erkenntlich an der dunkleren Augenfarbe, werden dann untereinander gekreuzt, um einen stabilen Stamm zu erhalten.

3.2.10. Immunhistochemische Färbung von *Drosophila*-Embryonen

(Mitchison und Sedat, 1983; Freeman et al., 1986; Steller, persönliche Mitteilung)

PBS:	130 mM	NaCl
	7 mM	Na_2HPO_4
	3 mM	NaH_2PO_4
PBT:	0,1 %	Tween 20 in PBS
Fixierungs-Lösung:	4 %	Paraformaldehyd in PBS
BBS:	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	55 mM	NaCl
	40 mM	KCl
	7 mM	$MgCl_2$
	5 mM	$CaCl_2$
	20 mM	Glucose
	50 mM	Saccharose
BBT:	0,1 %	Tween 20
	0,1 %	BSA in BBS
Färbungs-Lösung:	0,5 mg/ml	Diaminobenzidin
	0,3 mg/ml	$NiCl_2$ in PBT

Embryonen werden gesammelt, dechorionisiert und gewaschen, wie in Abschnitt 3.2.9.2. beschrieben ist, und mit einem Pinsel in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Zum Fixieren gibt man je 0,5 ml n-Heptan und Fixierungs-Lösung dazu und schüttelt kräftig für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Beide Phasen werden vorsichtig abpipettiert und die Embryonen zweimal mit 0,5 ml Heptan gewaschen. Nach Zugabe von 0,5 ml Heptan und 0,5 ml Methanol wird die Vitellinmembran durch heftiges Schütteln (1 min) entfernt, wobei die Embryonen zu Boden sinken. Heptan und Methanol, sowie in der Interphase verbleibende Embryonen werden vorsichtig abgezogen, die Embryonen zweimal mit Methanol gewaschen. In Methanol lassen sich die Embryonen für längere Zeit bei 4°C aufbewahren.

Nach Entfernen des Methanols werden die Embryonen unter leichtem Schütteln 4 x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml BBT gewaschen. Dann werden die Embryonen in 500 µl Antikörper-Lösung (geeignete Verdünnung in BBT) für 2 - 3 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) leicht geschüttelt. Man wäscht die Embryonen 2 x 10 Minuten mit BBT und blockt 2 x 30 Minuten in BBT mit 2 % Serum (aus der Spezies des zweiten Antikörpers). Vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper sollte dieser präabsorbiert werden: 100 µl fixierte und gewaschene Embryonen werden mit 1 ml einer 1 : 10-Verdünnung des Antikörpers in BBT wie oben inkubiert. Die vorinkubierte Antikörper-Lösung wird dann in BBT mit 2 % Serum geeignet verdünnt (bei Verwendung des biotinylierten Antikörpers aus dem "Vectastain ABC Kit" nochmals 1 : 50). Dann gibt man 500 µl von dieser Verdünnung auf die geblockten Embryonen und inkubiert für 2 - 3 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Gewaschen werden die Embryonen 4 x 20 Minuten mit PBT. Bei Verwendung des "Vectastain ABC Kit" läßt man in der Zwischenzeit 100 µl Lösung A (Avidin) und 100 µl Lösung B (biotinylierte Peroxidase) in 10 ml PBT 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubieren. Dann werden die Embryonen 30 Minuten unter leichtem Schütteln in 0,5 ml dieser Lösung inkubiert und 3 x 10 Minuten mit PBT gewaschen. Zu den Embryonen gibt man 0,6 ml Färbungs-Lösung und pipettiert die aufgewirbelten Embryonen (mitsamt der Färbungs-Lösung) in ein Glasschälchen. Die Färbungsreaktion wird durch Hinzufügen von 20 µl 0,3 % H_2O_2 gestartet und durch Waschen mit PBT gestoppt.
Die gefärbten Embryonen werden 3 x 10 Minuten mit Ethanol entwässert und auf Objektträgern in Epon eingebettet. Fotografiert werden die Embryonen am Leitz-Fotomikroskop mit Nomarski-Optik.

4. ERGEBNISSE

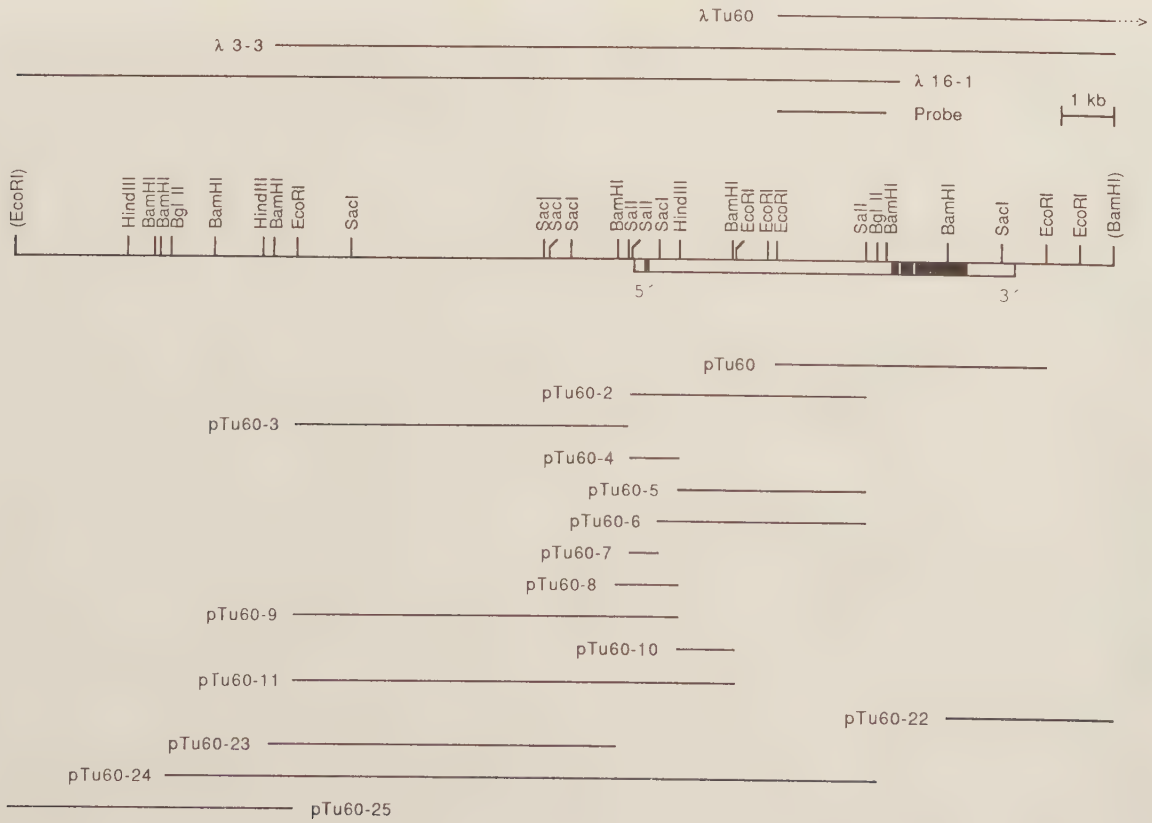
4.1. Analyse der Struktur des ß3-Tubulingens

4.1.1. Klonierung des ersten Exons und des Promotorbereiches

Als Voraussetzung für die Analyse regulatorischer Elemente des ß3-Tubulingens bestand zunächst die Notwendigkeit einer weitergehenden Charakterisierung der Transkriptionseinheit. Als Ausgangspunkt hierfür diente DNA eines genomischen λ Phagen (λTu 60), der von S. Bialojan mittels Kreuzhybridisierung zum konstitutiv exprimierten ß1-Tubulingen isoliert worden war (Bialojan, 1985). Die Kreuzhybridisierung beschränkte sich auf ein 5 kb großes EcoRI-Restriktionsfragment (pTu60) dieses Phagen (siehe Abbildung 1). Partielle DNA Sequenzanalyse kreuzhybridisierender Bereiche und Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit denen bekannter ß-Tubulingene verschiedener Spezies ergab, daß dieses DNA-Fragment den überwiegenden Teil des aminosäurekodierenden Bereiches enthielt. Es zeigte sich jedoch, daß der für die amino-terminalen Aminosäuren kodierende Anteil nicht in pTu60 enthalten war. Es bestand also zunächst die Notwendigkeit benachbarte Sequenzen aus einer Bank genomischer *Drosophila*-DNA zu isolieren, um dann den Transkriptions- und Translationsstart des ß3-Tubulingens lokalisieren zu können.
Dazu wurde ein etwa 2,0 kb großes BamHI/EcoRI-Restriktionsfragment aus dem Subklon pTu60 isoliert (siehe Abb. 1). Mit diesem Fragment hybridisierende Phagen wurden dann aus einer genomischen Bank von *Drosophila melanogaster* Oregon R isoliert (freundlicherweise von V. Pirotta zur Verfügung gestellt). Für das jeweilige *Drosophila*-DNA-Insert der dabei erhaltenen Phagen wurde eine grobe Restriktionskarte erstellt. Von DNA zweier dieser Phagen, deren Inserts am weitesten distal gelegene Sequenzen beinhalteten (λ 3-3 und λ 16-1), wurden verschiedene Subklone und eine genauere Restriktionskarte hergestellt (siehe Abb. 1).

Abb. 1 (Seite 41): Genomische Karte des ß3-Tubulingens

Die Restriktionskarte wurde an Hand der DNA von λ 16-1 und λ 3-3, sowie von einzelnen der aus ihnen hergestellten Subklone (pTu60-2 bis pTu60-22 aus λ 3-3 und pTu60-23 bis pTu60-25 aus λ 16-1) ermittelt. Mit Ausnahme von pTu60-3 (pUC8) und pTu60-22 bis pTu60-25 (pUC18) wurden alle der gezeigten Subklone im Vektor pUC19 hergestellt. Zur besseren Orientierung wurde das Insert von λ Tu60 und pTu60 (siehe Bialojan, 1985), die aus pTu60 isolierte Probe (siehe Text), sowie die Struktur des ß3-Tubulingens (siehe Text; Rudolph et al., 1987), ebenfalls angegeben.


λTu60
λ 3-3
λ 16-1
Probe
1 kb
(EcoRI)
HindIII
BamHI
BamHI
Bgl II
BamHI
HindIII
BamHI
EcoRI
SacI
SacI
SacI
SacI
BamHI
SalI
SalI
SacI
HindIII
BamHI
EcoRI
EcoRI
EcoRI
SalI
Bgl II
BamHI
BamHI
SacI
EcoRI
EcoRI
(BamHI)
5´
3´
pTu60
pTu60-2
pTu60-3
pTu60-4
pTu60-5
pTu60-6
pTu60-7
pTu60-8
pTu60-9
pTu60-10
pTu60-11
pTu60-22
pTu60-23
pTu60-24
pTu60-25

Um das 5´-Ende des ß3-Tubulingens zu lokalisieren, wurden die Inserts der Subklone pTu60-3, -4 und -5 dann an filtergebundene mRNA aus *Drosophila*-Embryonen hybridisiert. Dabei ließen pTu60-3 und pTu60-5 DNA keine, pTu60-4 DNA jedoch spezifische Hybridisierung mit der ß3-mRNA (2,5 kb) erkennen (siehe Abb. 2). Im Gegensatz zur Hybridisierung mit dem Subklon pTu60, der nahezu den gesamten aminosäurekodierenden Teil des ß3-Tubulingens enthält, wurde keine Kreuzhybridisierung mit der konstitutiv-exprimierten ß1-Tubulin-mRNA (1,8 kb) beobachtet. Das in diesem Subklon liegende Exon sollte also hauptsächlich 5´-untranslatierte Sequenzen enthalten. Bei der daraufhin durchgeführten Sequenzanalyse von pTu 60-4 konnte das Translationsinitiationskodon (AUG) identifiziert werden, da es zusammen mit den nachfolgenden 18 Tripletts die, zu anderen ß-Tubulinen konservierte, aminoterminale Sequenz kodiert und zudem bekannt war, daß zwischen den Tripletts für Aminosäure 19 und 20 ein Intron im ß3-Tubulingen liegt (Elizabeth Raff, persönliche Mitteilung). Da in weiteren 6 kb an benachbarten Sequenzen (pTu 60-3) keine Hybridisierung mit der ß3-mRNA beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt) schien es wahrscheinlich, daß der Subklon pTu 60-4 gleichzeitig den Transkriptionsstart beinhaltete.

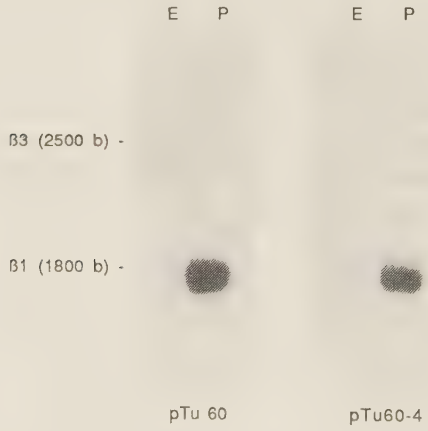
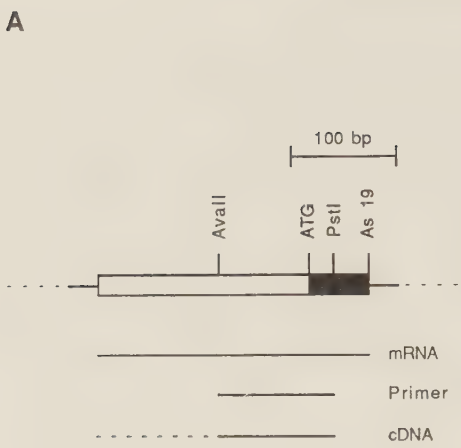


Abb. 2: Transkriptionsanalyse von pTu 60-4

Je 10 µg Gesamt-RNA aus 9 - 12 h alten Embryonen (E) oder Puppen (P) wurden in einem 1,2% Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und auf "GeneScreen"-Filter transferiert. Hybridisierung erfolgte mit dem nicktranslatierten Insert von pTu60-4 bzw. pTu60 (vgl. Abb. 1).

4.1.2. Lokalisierung des Transkriptionsstarts

Um den Transkriptionsstart eines Gens zu lokalisieren, wendet man üblicherweise zwei verschiedene Methoden an: Die Kartierung mittels S1-Nuklease und die "Primer Extension"-Analyse. Für eine S1-Analyse hybridisiert man ein endmarkiertes genomisches Fragment an RNA, wobei das eine (markierte) Ende in einem Exon des Gens liegen muß und das andere außerhalb des transkribierten Bereiches oder im benachbarten Intron liegen sollte. Nach einem Verdau der Hybride mit einzelstrangspezifischer S1-Nuklease kann aus der Größe des endmarkierten Fragmentes geschlossen werden, wie weit die Markierungsstelle vom Transkriptionsstart bzw. der nächsten Intron/Exon-Grenze entfernt liegt. Zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten dient die "Primer Extension"-Analyse: Man hybridisiert einen zur mRNA komplementären "Primer" an diese und verlängert dann mit Reverser-Transkriptase. Aus der Größe des Produktes kann man schließen wie weit das 5´-Ende der mRNA von der Hybridisierungsstelle entfernt liegt. Stimmt diese Stelle mit der in der S1-Analyse bestimmten überein, so handelt es sich um den Transkriptionsstart.
Für die "Primer Extension"-Analyse wurde das 105 bp große AvaII/PstI-Fragment aus pTu 60-4 verwendet (siehe Abb. 3A). Nach Denaturieren des Fragmentes, Hybridisieren an embryonale Gesamt-RNA und anschließender Verlängerung mit Reverser-Transkriptase (in Anwesenheit radioaktiv-markierter Nukleotide), erhält man cDNAs mit einer Länge von bis zu 220 b (siehe Abb. 3B). Aus einer Länge von 220 b ergibt sich in Übereinstimmung mit der nachfolgend beschriebenen S1-Analyse eine Startposition, die 115 bp in 5´-Richtung von der AvaII-Schnittstelle liegt. Die kürzeren cDNAs in Abb. 3 sind wahrscheinlich auf vorzeitigen Polymerisationsabbruch infolge Sekundärstruktur der ß3-mRNA oder unspezifische Hybridisierung des "Primers" zurückzuführen. Gegen die Existenz weiterer Transkriptionsstarts spricht die bei höherer Reaktionstemperatur (vergleiche 45°C und 42°C in Abb. 3) zu beobachtende relative Zunahme der Intensität von größeren, verglichen mit kleineren, Banden.
Für die S1-Analyse wurde ein 1,3 kb großes AvaII-Fragment aus dem Subklon pTu 60-4 isoliert, dephosphoryliert und mit Polynukleotid-Kinase an den 5´-Enden markiert. Das durch Nachschneiden mit EcoRI erhaltene Fragment von 180 bp Länge (siehe Abb. 4A) ist nur noch am 5´-Ende des zur mRNA komplementären Stranges markiert (an der AvaII-Schnittstelle 86 Nukleotide vor dem ATG, vgl. Abb. 6). Das 3´-Ende dieses Stranges enthält 33 Nukleotide pUC19-Polylinker-Sequenz (zwischen EcoRI und SalI). Dies wurde absichtlich so gewählt, damit ein eventueller



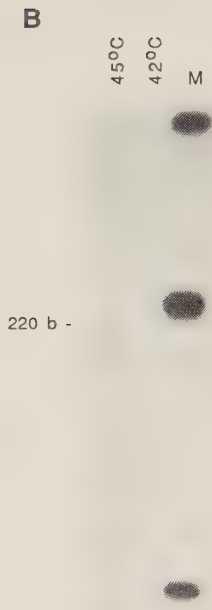
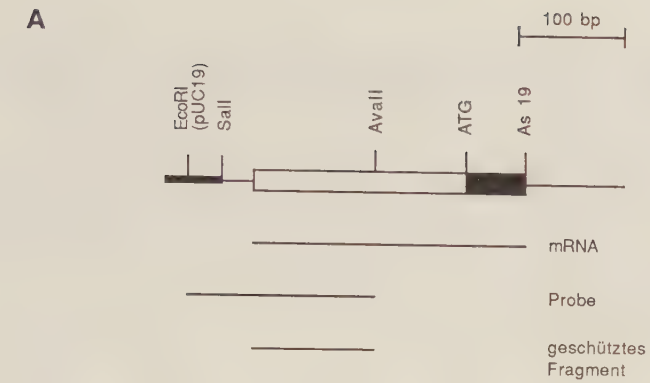


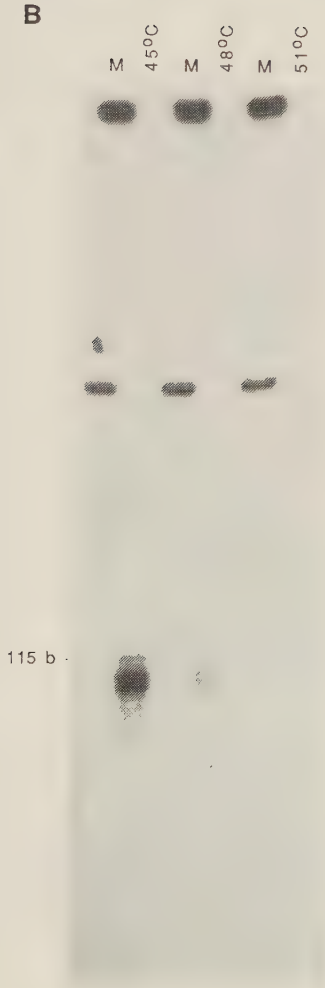
Abb. 3: "Primer Extension"-Analyse

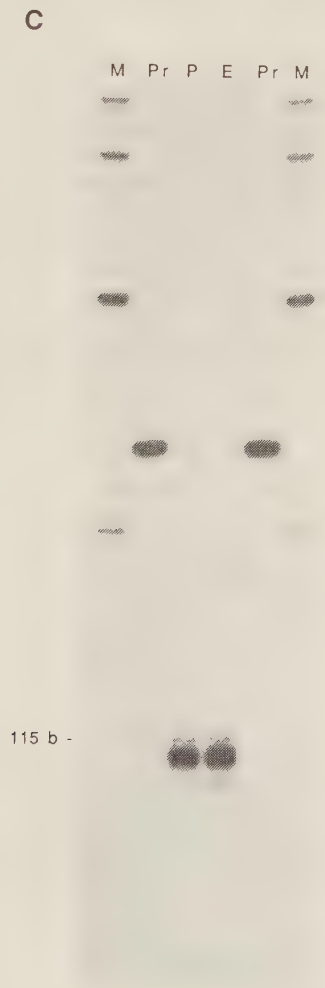
A: Das abgebildete Schema zeigt einen Ausschnitt des Subklons pTu60-4, sowie die relative Orientierung des Primers und der synthetisierten cDNA.
B: 10 µg Gesamt-RNA aus Embryonen (9 - 12 h) wurden mit ca. 10 ng des AvaII/ PstI-Fragmentes aus pTu60-4 denaturiert. Die Verlängerungsreaktion mit 7,5 U Reverser-Transkriptase fand in Anwesenheit von (α-^{32}P)-dATP für 1 h bei 42°C oder 45°C statt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem denaturierenden 6%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Marker (M) diente pBR322 mit HinfI geschnitten.

Abb. 4 (Seite 45): S1-Analyse

A: Das Schema zeigt einen Ausschnitt des Subklons pTu60-4. Als Probe wurde das, an der AvaII-Schnittstelle markierte, 180 bp lange EcoRI/AvaII-Fragment eingesetzt.
B: 35 µg Gesamt-RNA aus 9 - 12 h alten Embryonen wurden mit 50000 cpm (ca. 0,05 pMol) Probe denaturiert und dann über Nacht bei 45°C, 48°C oder 51°C hybridisiert. Der Verdau wurde für 3 h bei 20°C mit 1000 U/ml S1-Nuklease durchgeführt. Auftrennung erfolgte in einem 6% Polyacrylamidgel. Als Marker (M) diente pBR322 mit HinfI geschnitten.
C: S1-Analyse mit 20 µg Gesamt-RNA aus 9 - 12 h alten Embryonen (E) oder Puppen (P). Hybridisiert wurde bei 45° C, ansonsten waren die Versuchsbedingungen wie in B (Pr: Probe).


A
100 bp
EcoRI
(pUC19)
SalI
AvaII
ATG
As 19
mRNA
Probe
geschütztes
Fragment


B
M
45°C
M
48°C
M
51°C
115 b


C
M
Pr
P
E
Pr
M
115 b

Schutz des Stranges durch genomische DNA bzw. ein außerhalb des Fragmentes liegender Transkriptionsstart leicht erkannt würde. In diesem Fall sollte der markierte Strang nur um die Linker-DNA verkürzt werden.
Um zunächst die optimalen Hybridisierungsbedingungen für die S1-Analyse zu bestimmen, wurde die Hybridisierung mit embryonaler Gesamt-RNA bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (45°C, 48°C, 51°C). In Abbildung 4B erkennt man, daß die optimale Hybridisierungstemperatur 45°C beträgt und daß ca. 115 b vor S1-Nuklease-Abbau geschützt sind.
Da sowohl mit der Primer-Extension-Analyse wie auch mit der S1-Analyse die gleiche Stelle kartiert wurde, in beiden Fällen 115 Nukleotide in 5´-Richtung von der AvaII-Schnittstelle, handelt es sich hierbei mit Sicherheit um den Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens.
Die zunächst mit embryonaler RNA durchgeführte S1-Analyse wurde dann mit RNA aus Puppen wiederholt. Dadurch sollte die Frage entschieden werden, ob das ß3-Tubulingen in beiden Expressionsphasen an der gleichen Stelle initiiert wird. Wie man in Abbildung 4C erkennt, findet die Initiation der Transkription in beiden Stadien an der gleichen Stelle statt.
Das für die S1-Analyse eingesetzte Fragment wurde dann nach der chemischen Methode von Maxam und Gilbert sequenziert. Die Sequenzreaktionen und die vor S1-Nuklease-Abbau geschützten Fragmente wurden anschließend auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb 5). Dies erlaubte eine exakte Bestimmung des Transkriptionsstarts. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß der kodierende Strang sequenziert wurde, die Sequenz der mRNA daher komplementär zur abgelesenen Sequenz ist. Außerdem muß die so ermittelte Position um ein Nukleotid korrigiert werden, da im Gegensatz zum geschützten Fragment bei der Spaltungsreaktion nach Maxam und Gilbert die modifizierte Base abgespalten wird. Geht man von der längsten vor S1-Abbau geschützten Bande aus, so ermitteln sich die ersten Nukleotide am 5´-Ende der ß3 mRNA zu ATCAGTT. Diese Konsensussequenz findet sich am 5´-Ende vieler *Drosophila*-mRNAs (Snyder et al., 1982; Hultmark et al., 1986). Das 5´-Ende einer ß3-cDNA (Gasch et al., 1988; siehe auch Abb. 14) endet mit dem Cytosin-Rest bei Position +3.
Die bisher geschilderten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfaßen. Das erste Exon des ß3-Tubulingens ist vom zweiten durch ein ca. 4,5 kb großes Intron getrennt und hat eine Länge von 259 Nukleotiden. Es enthält das Kodierungspotential für die ersten 19 Aminosäuren. Ein Intron nach dem Kodon für Aminosäure 19 findet sich auch beim konstitutiv-exprimierten ß1-Tubulingen (Michiels et al., 1987) und bei allen bisher untersuchten

Vertebraten-ß-Tubulingenen (Cleveland und Sullivan, 1985; Lewis et al., 1985). Der 5´-untranslatierte Bereich ist sowohl in Puppen wie auch in Embryonen mit einer Länge von 202 Nukleotiden ungewöhnlich lang. Ein Vergleich der 5´-untranslatierten Bereiche 211 verschiedener mRNAs ergab für nur fünf eine Länge von mehr als 200 Nukleotiden (Kozak, 1984). Aus den bekannten Längen der ß3-mRNA von 2,5 kb, des 5- untranslatierten Bereiches von 0,2 kb, der aminosäurekodierenden Sequenzen von 1,3 kb, sowie eines poly-Adenosin-Schwanzes von ca. 0,2 kb (vgl. Nevins, 1983) läßt sich für den 3´-untranslatierten Bereich eine Länge von ca. 0,8 kb errechnen, was mit der Struktur einer ß3-cDNA (Gasch et al., 1988) übereinstimmt.

Abb. 5: S1-Kartierung des ß3-Tubulin-Transkriptionsstarts

20 µg Gesamt-RNA aus 9 - 12 h alten Embryonen (E) wurden bei 45°C über Nacht mit 30000 cpm (ca. 0,03 pMol) Probe hybridisiert. Der S1-Verdau wurde bei 15°C wie in Abb. 4b durchgeführt. In einem 6% Polyacrylamidgel wurden dann die vor S1-Abbau geschützten Fragmente neben den Spaltprodukten von Maxam & Gilbert-Reaktionen der Probe aufgetrennt.

4.1.3. Sequenzanalyse des ersten Exons und des Promotorbereichs

Als Vorraussetzung für eine funktionelle Analyse des ß3-Tubulingens sollte neben dem transkribierten Bereich auch der Promotorbereich sequenziert werden, um diesen dann auf das Vorhandensein bekannter Sequenzelemente untersuchen zu können und um einen Vergleich zu den anderen *Drosophila*-ß-Tubulingenen durchführen zu können.
Die insgesamt zwischen -604 und +996 relativ zum Transkriptionsstart ermittelten Sequenzen sind in Abb. 6 zusammengefaßt. Am 5´-Ende der ß3-mRNA findet sich, wie bei vielen *Drosophila*-mRNAs, das schon erwähnte Sequenzmotiv ATCAGTT. Hingegen kann in der Region um -30 vor dem Transkriptionsstart keine Homologie zur sonst üblichen TATA-Box erkannt werden.

```
-604  TTTTAGCCCA GTCATAATAC AGTCACTATT TTATTGGTAC AAAACAACAG
-554  GCACTACTCG AAAGCGAGTT TTTCGAATAT GAAGATATGG CAAAGTTTAA
-504  TAATTTTTAG AAACATTTTT ATTAAATTAC AGCTCAAATG CCTCAGTAAT
-454  TTCTCAAAAC AACAAACGAT AAATGAAACT TTAAAAATTA AAGTTCAATG
-404  GTGTAAGGGA GTGAGTCAAA GGCAAAATTA GTCAACTGTT TTTAGTCACT
-354  AATTTGATTA CGATTTCAAG CAAAATAACT GAAAAGATTG GATATCATGA
-304  AGTAACTTGC TTAAAAATAT GATTGAATAA TAATGACAGC TGAGTTAACT
-254  TATTGTGTTC AACTTGCATT TTTGTTGGAT CCCAAGAGGA GCTGCCATGT
-204  GGCGAGTTTT GAGCTGGATA ACTCCGCATT GGCCCCACTG TGCGCACTGT
-154  GGCTGTTTGC GTATCTGTGT GCGTGTCGGT GCGCCGGTGC CTCGGTGTGT
-104  GAGTGCGATC GGCCGTCTCG CTCTGGCCGC AGCGTCGGCA CTCGAGTCGC
 -54  AGTCGACTCA AAGTCACCAG AACATCGTCG ACGGACTCGA GTTTTGTTCC
  -4  GCCGATCAGT TGTGTCTTGT GCGTTGTGCG GTGAAGTTGC GCCTTCGTTC
 +47  TGAAACCTAA TAAGCTGAGA ATCAGAACCT CTGGACATCT GAACGTCTGA
 +97  AAATCCAGCA GCAGCTACTC GGACCGTGCG GTGCATCCTT CTCCAGACTG
+147  AGACTAAGAT CCGATTCCAG CCTTAGCCTT CGACCCCACA AATCGCCGCT
+197  TTCAAGATGA GAGAAATCGT GCACCTGCAG GCCGGCCAGT GCGGCAACCA
          M  R   E  I  V   H  L  Q   A  G  Q  C   G  N  Q
+247  AATCGGCGCT AAGGTAGGTC TCGTCACTAG TCTCTTTTCC AACTCACATT
      I  G  A   K
+297  TTCTCGAGTC GGCCGATCGC CGATTTCTGG TAGCACTTAA TTTATTCAGA
+347  TTGCCCGAAA ACGTTTTTCA ATGAGTTTCC AAAATGATCG GCTGCGGTGC
+397  GCAGTTCGAT GTCGCCGCCT TTTTCAGCGC ATTCAGCAAT TAAAGCGAAA
+447  GAAAATTAAC AAAAAAAAAA AAAAAAAAGA ACAGATACGT TAAATAAAAA
+497  ATGCAAAGTG CAAAAAGTGG ACGTTGAAAG AAACTTATTT TGAGCTCGTC
+547  TGGCACTCGA TATGCCCTTT CTGCTTCGCA AAATTCGCTC AAGACGAAGA
+597  AAAAAAGAAA ACGGGTTGGG CCGGCTGCAG ATCACGAAAA GTGATTCATG
+647  GCAAACCCTG CCGGGGAAAT TGGGCGGGGA ACTTTGGGAG GGAGAATTGT
+697  GGCTGAGGCG CAAATCAGCG AGGAAACTTC TGGGGACTTT TGCAATTTTT
+747  TGACGCCGAG AAGGGAAATC TCTTGAATTA TCTGACCGGA GAAATCTTTT
+797  CGCTTTGCTT GAGTTTCCTG CGCTCCAAAG AAACCACAAA AATTGCAATA
+847  AAAGAAGCAA TAGTATGTAA AGAAAGCTTT ATACGTTGGT TGGGCAATAT
+897  AACTTGATTT CAGTAGCAAA CTCACTGGAG TAGTAACTGA AGTCCATCAT
+947  TAATATTTAT GAATATAATG TACACAGTTA TCCAATTTTT CCCGAAGCTA
```

Abb. 6: Sequenz von Promotor und 5´-Ende des ß3-Tubulingens

Die hier gezeigte Sequenz wurde entweder von beiden Strängen oder mit zwei unterschiedlichen Methoden (nach Sanger oder Maxam & Gilbert) bestimmt. Außerdem wurde überlappend sequenziert, um den Verlust kleinerer Restriktionsfragmente erkennen zu können. Das erste Exon ist unterstrichen; gezeigt sind auch die ersten 19 Aminosäuren.

4.2. Analyse der Regulation des ß3-Tubulingens

Zur Lokalisation von Elementen, die die entwicklungsspezifische Expression eines Gens regulieren, mutagenisiert man diese üblicherweise zunächst *in vitro* und testet ihre biologische Aktivität dann in einem geeigneten Testsystem. Solche Testsysteme sind zum Beispiel die *in vitro*-Transkription, die Transfektion, Mikroinjektion oder Keimbahn-Transformation. Mit letzterer Methode erhaltene Ergebnisse besitzen sicherlich die höchste Aussagekraft, insbesondere dann, wenn es sich um Gene handelt, die im Verlauf eines Differenzierungsprozesses exprimiert werden, wie es für das ß3-Tubulingen der Fall ist (vergleiche Abschnitt 4.2.2.1.). Da gegenüber den anderen Methoden der Zeitaufwand jedoch erheblich ist, erschien es vor der Keimbahntransformation zunächst sinnvoll, einzelne Fragestellungen mittels der transienten Expression nach Mikroinjektion in *Drosophila*-Embryonen zu überprüfen (siehe Abschnitt 4..2.1.2).

4.2.1. Analyse transienter Expression nach Mikroinjektion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen in *Drosophila*-Embryonen

Bevor man die Aktivität eines *in vitro*-modifizierten Gens *in vivo* untersuchen will, muß bedacht werden, daß das Genprodukt des eingebrachten von dem des endogenen Gens (die Expression soll ja auf dieses relativiert werden) unterscheidbar und gleichzeitig möglichst einfach nachweisbar sein sollte. Um beides miteinander zu verbinden, werden die kodierenden Anteile des zu untersuchenden Gens zweckmäßigerweise gegen die kodierenden Anteile eines geeigneten Indikatorgens ausgetauscht. Für die Analyse regulierender Elemente des ß3-Tubulingens schien das *lacZ*-Gen von *E. coli* besonders gut geeignet, da die kodierte ß-Galaktosidase im mikroinjizierten und transgenischen Embryo durch Aktivitätsfärbungen, vor allem aber auch durch immunhistochemische Färbungen mittels käuflicher Antikörper nachgewiesen werden kann. Der mögliche Nachweis über Antikörper schien wegen der besseren Korrelierbarkeit zum ebenfalls immunhistochemisch durchgeführten Nachweis der ß3-Tubulin-Verteilung und wegen der höheren Auflösung gegenüber einer Aktivitätsfärbung besonders wichtig.

4.2.1.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen zum Studium der transienten Expression

Als Ausgangsplasmid für die Fusion verschiedener ß3-Promotordeletionen an das *lacZ*-Gen wurde das Plasmid pCH110 gewählt (Hall et al., 1983). Dieses Plasmid enthält ein, am 5´-Ende

leicht modifiziertes, *lacZ*-Gen und eine SV40-Polyadenylierungsstelle. Da das *lacZ*-Gen ein ATG-Translationsinitiationskodon enthält, können Fusionen im 5´-untranslatierten Bereich des zu untersuchenden Gens durchgeführt werden. Hierfür bietet sich eine in pCH110 singuläre HindIII-Schnittstelle an, die sich 200 bp 5´ vor dem ATG befindet. Um solche Fusionen zu erleichtern, wurde zunächst ein pUC-Polylinker vor dem *lacZ*-Gen eingeführt. Dazu wurde das 5 kb große HindIII/ScaI-Fragment von pCH110 (dieses Fragment enthält das *lacZ*-Gen, die SV40-Polyadenylierungsstelle und 500 bp pBR322-Sequenz) mit dem 1,8 kb großen ScaI/HindIII-Fragment von pUC18 ligiert. Das resultierende Plasmid pUClac18 enthält einen pUC18 Polylinker am 5´-Ende des *lacZ*-Gens (siehe Abb. 7) und erlaubt so die Fusion zum 5´-untranslatierten Bereich des ß3-Tubulingens an mehreren Restriktionsschnittstellen.
Um die Fusion zwischen ß3-Promotorsequenzen und dem *lacZ*-Gen zu erleichtern, wurde an der AvaII-Schnittstelle bei +116 im Subklon pTu60-8 ein HindIII-Linker eingeführt (siehe Abb. 7). Das 350 bp lange BamHI/HindIII-Fragment (-228/+116) wurde dann mit dem 9 kb großen BamHI/HindIII-Fragment von pTu60-3 ligiert (dieses Fragment enthält den pUC-Vektor). Das resultierende Plasmid pTu60-Li enthält also 6 kb 5´-benachbarter Sequenzen, 116 bp 5´-untranslatierte Sequenzen und einen HindIII-Linker (Abb.7).

Abb. 7 (Seite 52): Konstruktion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen im 5´-untranslatierten Bereich des ß3-Tubulingens

Die Konstruktion von pUClac18 und pTu60-Li wird im Text beschrieben. Restriktionsstellen sind nur soweit für das Verständnis notwendig angegeben.
ß3/lac-6,0: Das ca. 8,0 kb große EcoRI/ScaI-Fragment von pTu60-Li wurde mit dem 5,0 kb großen HindIII/ScaI-Fragment aus pUClac18 ligiert.
ß3/lac-1,2: pUClac18 wurde mit SacI partiell gespalten und die 6,8 kb großen Fragmente dann präparativ isoliert. Durch Nachschneiden mit HindIII ließ sich daraus das gewünschte 6,8 kb große Fragment isolieren. Dieses Fragment wurde dann mit dem 1,3 kb großen EcoRI/HindIII-Fragment von pTu60-Li ligiert.
ß3/lac-0,23: pUClac18 wurde mit BamHI partiell gespalten und die linearisierte Form präparativ isoliert. Nach Schneiden mit HindIII wurde das 6,8 kb große Fragment isoliert und mit dem 350 bp langen BamHI/HindIII-Fragment von pTu60-Li ligiert.
ß3/lac-0,08: Zur Konstruktion wurde der von D. Buttgereit hergestellte Subklon pTu60-15 verwendet. Dieser Subklon enthält das 200 bp große HaeIII/HindIII-Fragment aus pTu60-Li in pUC19 (ligiert zwischen SmaI und HindIII). Aus diesem Subklon wurde das ca. 200 bp große EcoRI/HindIII-Fragment isoliert. Anschließend erfolgte eine Dreifachligation mit dem 4,5 kb großen HindIII/SalI und dem 2,7 kb großen SalI/EcoRI-Fragment (pUC) aus pUClac20 (siehe Abb. 10).
ß3/lac-0,03: Das 150 bp lange SalI/HindIII-Fragment aus pTu60-Li wurde mit SalI/HindIII-geöffnetem pUClac18 ligiert.

pUC8
ScaI
EcoRI
EcoRI
1 kb
β3
SacI
BamHI
HaeIII
SalI
HindIII
HindIII
ATG
lacZ
SV40
pBR
322
ScaI
pUC8
pTu60-Li
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
ATG
KpnI
ClaI
SacI
EcoRI
BamHI
PstI
ScaI
pUC
18
pUClac18
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
HindIII
ATG
pUC18
β3/lac-0,03
EcoRI
SacI
KpnI
(SmaI)
HindIII
ATG
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
pUC8
β3/lac-0,08
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
HindIII
ATG
pUC18
β3/lac-0,23
EcoRI
SacI
HindIII
ATG
pUC18
β3/lac-1,2
HindIII
ATG
ScaI
pUC8
β3/lac-6,0

Da die, neu eingeführte, HindIII-Schnittstelle auch singulär in pTu60-Li ist, konnten durch Schneiden mit HindIII und anderen geeigneten Restriktionsenzymen Deletionen mit verschiedenen Endpunkten isoliert werden. Diese wurden dann über die HindIII-Schnittstelle von pUClac18 mit dem *lacZ*-Gen fusioniert. Endpunkte der so hergestellten Fusionsgene waren: -29 (SalI), -80 (HaeIII), -228 (BamHI), -1,2 kb (SacI) und -6 kb (EcoRI) (siehe Abb. 7).

4.2.1.2. Nachweis der korrekten Initiation der Transkription

Nach Konstruktion der verschiedenen ß3/*lacZ*-Fusionsgene erschien es zunächst wünschenswert ihre biologische Aktivität in einem einfachen Testsystem zu überprüfen. Zu einer schnellen Beantwortung der Frage, ob in *Drosophila*-Embryonen eine korrekte Transkription stattfindet, schien die Analyse transienter Expression nach Mikroinjektion in Präblastoderm-Embryonen besonders geeignet. Mit Hilfe dieser Methode, die von Hermann Steller entwickelt wurde, konnte gezeigt werden, daß klonierte Gene aus *Drosophila* nach Mikroinjektion in frühe *Drosophila*-Embryonen (0-45 min) entwicklungsgemäß reguliert werden (Steller und Pirotta, 1984). So konnte für verschiedene, im Embryo transkribierte Gene mittels "Northern blots" gezeigt werden, daß diese nach Mikroinjektion transient exprimiert werden (Steller und Pirotta, 1984). Im Embryo normalerweise reprimierte Gene, blieben hingegen nach Mikroinjektion in *Drosophila*-Embryonen auch transkriptionell inaktiv. Die nach Injektion im Cytoplasma verbleibende DNA wird allmählich degradiert (Steller und Pirotta, 1985). Ein Teil der injizierten Plasmid-DNA wird jedoch in Kerne oder kernähnliche Strukturen eingeschlossen, wo sie die gesamte Embryonalentwicklung ohne nennenswerte Degradation überdauert. Ein Bruchteil der in die Kerne gelangten DNA wird in das Genom integriert. Unklar ist jedoch, welches die transkriptionell aktive Form ist. Da die injizierte DNA nur an einer Replikationsrunde teilnimmt, wird sie im Laufe der Entwicklung so verdünnt, daß sie nur noch in einem Bruchteil der Kerne vorhanden ist (Steller und Pirotta, 1985). Trotzdem gelang mit dieser Methode auch für 2 larval exprimierte Gene (*Adh*, *Sgs-5*) die Einengung regulativer Elemente (Martin et al., 1986; Shore und Guild, 1987).
Um den Nachweis zu erbringen, daß die ß3/*lacZ*-Fusionsgene nach Mikroinjektion in *Drosophila*-Embryonen korrekt initiiert werden, wurde die o.g. Methode folgendermaßen modifiziert. Mit Plasmid-DNA der verschiedenen ß3/*lacZ*-Konstrukte wurden Serien von je 50 Präblastoderm-Embryonen injiziert. Nach verschiedenen Entwicklungszeiten der injizierten Embryonen bei 25°C wurde RNA aus diesen Embryonen extrahiert und diese RNA dann einer S1-

Nuklease-Kartierung unterzogen. Diese S1-Analysen wurden simultan mit zwei unterschiedlichen Proben durchgeführt. Dadurch ließen sich die Transkripte des mikroinjizierten und des endogenen Gens voneinander unterscheiden (Schema siehe Abb. 8A). Zudem konnte durch die interne Kontrolle überprüft werden, ob die RNA-Präparation erfolgreich war, und die Transkriptionsrate des endogenen und des injizierten Gens zumindest grob verglichen werden.

In einem ersten Versuch wurden Embryonen mit ß3/lac-0,23 oder ß3/lac-1,2 injiziert. Nach weiteren 9 Stunden bei 25°C, ein Zeitpunkt an dem maximale Expression des ß3-Tubulingens zu erwarten ist, wurde RNA präpariert und die S1-Analyse durchgeführt. Wie man in Abb. 8B erkennt, werden beide Fusionsgene vom korrekten Start transkribiert, da jeweils beide Proben um die erwarteten 23 Nukleotide verkürzt werden. Beide Fusionsgene scheinen zudem mit ähnlicher Effizienz transkribiert zu werden. Wie man in Abbildung 8C (Spur 0,03) erkennt, findet man auch in Embryonen, die mit ß3/lac-0,03 injiziert wurden, korrekt initiierte Transkripte. Dieses Ergebnis wurde mehrfach reproduziert (U. Hinz und R. Renkawitz-Pohl, persönliche Mitteilung) und wird in Abschnitt 5.2.1. ausführlich diskutiert. Verglichen mit längeren Fusionsgenen, scheint die Rate der Transkription allerdings deutlich abzunehmen.

Um zu überprüfen, ob die Transkription der injizierten Konstrukte entwicklungsgemäß kontrolliert ist, wurden diese Analysen wiederholt, wobei jedoch die RNA nach unterschiedlichen Entwicklungszeiten präpariert wurde. Wie bei der in Abb. 8C (Spuren 4 h, 10 h und 20 h) beispielhaft gezeigten Analyse für ß3/lac-0,23, wurden dabei auch für die längeren Fusionsgene vergleichbare Resultate erhalten. Wie bereits bekannt war (Bialojan et al., 1984), beobachtet man die stärkste Expression des ß3-Tubulingens in der mittleren Embryogenese (10 h in Abb. 8C). Das ß3/lac-0,23-Konstrukt wird hingegen bereits in 4 h alten Embryonen sehr stark transkribiert. In 10 h und 20 h alten Embryonen nimmt die Stärke des Signals jedoch deutlich ab. Dies könnte mit dem Fehlen wichtiger regulativer Elemente in den analysierten Promotorbereichen zusammenhängen. Durch mehrfache Wiederholungen dieser Experimente wurden jedoch die Schwachstellen der Methode deutlich und die obige Erklärungsmöglichkeit zumindest fragwürdig: Zum einen traten zwischen den einzelnen Injektionsserien starke Schwankungen der injizierten DNA-Menge auf (bedingt durch unterschiedliche Kapillardurchmesser, Trocknungszeiten etc.), so daß einzelne Serien untereinander nicht verglichen werden konnten. Zum anderen war aus Untersuchungen von H. Steller bekannt, daß ein Großteil der injizierten DNA im Laufe der Entwicklung degradiert und "herausverdünnt" wird. Ein Vergleich der verschiedenen

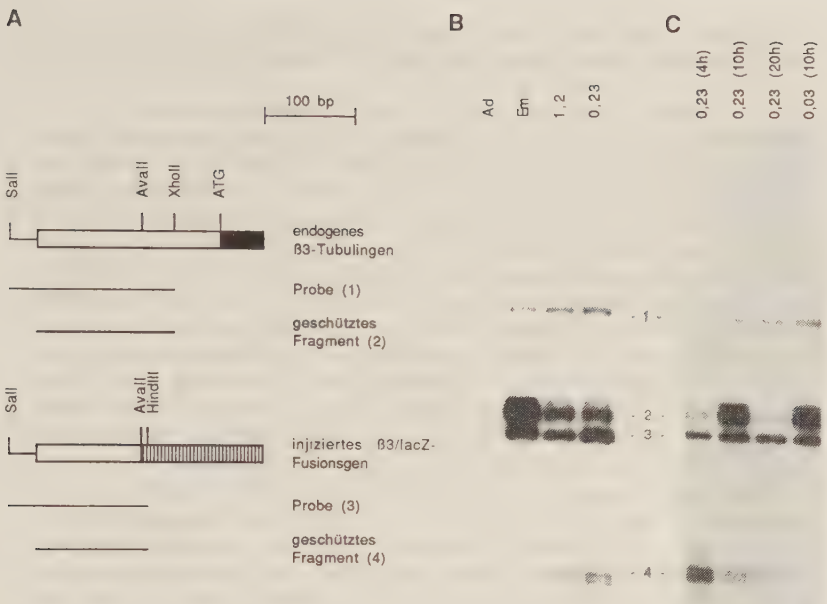


Abb. 8: Nachweis der transienten Expression von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen mittels S1-Analyse

A: Das Schema zeigt die für die S1-Analyse verwendeten Proben. Markierung erfolgte an der XhoII-Schnittstelle bei +152 in pTu60-7 bzw. an der HindIII-Schnittstelle bei +123 in ß3/lac-1,2. Nachgeschnitten wurde in beiden Fällen mit SalI (-28).
B: 50 Embryonen im Alter von 15 - 60 min wurden mit mit einer DNA-Lösung (Konzentration 0,5 mg/ml) von ß3/lac-1,2 (1,2) oder ß3/lac-0,23 (0,23) injiziert. Nach einer Entwicklungszeit von weiteren 9 h bei 25°C wurde Gesamt-RNA präpariert und eine S1-Analyse durchgeführt. Dazu wurden je 50000 cpm der in A gezeigten Proben mit den beiden RNA-Präparationen bei 45°C über Nacht hybridisiert. Als Kontrollen wurden 20 µg Gesamt-RNA aus Adulten (Ad) bzw. 10 µg Gesamt-RNA aus 9 - 12 h alten Embryonen (Em) unter gleichen Bedingungen mit beiden Proben hybridisiert. Inkubation mit 5000 U/ml S1-Nuklease erfolgte für 3h bei 21°C. Die Produkte wurden dann in einem denaturierenden 6%-Polyacrylamidgel aufgetrennt.
C: ca. 50 Embryonen wurden wie in B mit ß3/lac-0,23 (0,23) oder ß3/lac-0,03 (0,03) injiziert. Nach weiteren 3h (4h), 9h (10h) oder 19h (20h) bei 25°C wurde Gesamt-RNA präpariert und die S1-Analyse wie in B durchgeführt.

Fusionsgene bezüglich ihrer Transkriptionseffizienz im Laufe der Embryogenese ohne eine geeignete Kontrolle schien daher unmöglich.
Um zu klären, ob die Fusionsgene gewebespezifisch korrekt exprimiert werden, wurden injizierte Embryonen unterschiedlichen Alters fixiert und durch histochemische Färbung mit X-Gal auf Anwesenheit funktionsfähiger ß-Galaktosidase untersucht. Nach Injektion sämtlicher, in Abbildung 7 gezeigter, Fusionsgene konnte so die Enzymaktivität, erkenntlich an der charakteristischen Blaufärbung, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch die mit ß3/lac-0,03 injizierten Embryonen zeigten vereinzelt schwache Blaufärbung. Eine Aussage über die korrekte gewebespezifische Verteilung konnte mit Hilfe dieser Methode jedoch nicht getroffen werden. Zum einen zeigte ein Großteil der Embryonen eine, durch die Injektion bedingte, aberrante Entwicklung verschiedener Gewebe, was die Interpretation der beobachteten Expressionsmuster sehr erschwerte. Durch die Aufarbeitung bis zur Färbereaktion wurden die Embryonen zudem mechanisch stark beansprucht, was die Identifizierung der verschiedenen Gewebe beinträchtigte. Die größte Schwierigkeit bei der Interpretation der erhaltenen Muster bestand jedoch darin, daß die injizierte DNA stets nur in einen Bruchteil der embryonalen Zellen gelangte, man also Mosaike erhielt. In Verbindung mit dem komplexen Muster der ß3-Expression (siehe Abb. 9) machte dies eine Aussage über eine, möglicherweise korrekte, gewebespezifische Regulation durch eine oder auch mehrere der analysierten Deletionen unmöglich.
Die in diesem Abschnitt geschilderten Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, daß die konstruierten ß3/*lacZ*-Fusionsgene eine korrekte Initiation der Transkription ermöglichen. Somit erbrachten die hier geschilderten Analysen einen wichtigen Hinweis darauf, daß weitere beabsichtigte Experimente mit diesen Fusionsgenen, vor allem die Einengung *cis*-regulierender-Elemente nach Keimbahntransformation, erfolgversprechend schienen.

4.2.2. Vergleich der gewebespezifische Expression des ß3-Tubulingens mit der verschiedener ß3/*lacZ*-Fusionsgene in transgenen Embryonen

Die im vorangegangenen Kapitel geschilderten Ergebnisse zeigten, daß die Transkription an den verschiedenen ß3/*lacZ*-Fusionsgenen korrekt initiiert wird. Die Expression konnte zudem am Vorhandensein aktiver ß-Galaktosidase nachgewiesen werden. Eine Einengung *cis*-regulierender DNA-Elemente durch Analyse der transienten Expression, erwies sich jedoch aus oben genannten Gründen als schwierig. Für die Einengung solcher Elemente wurde deshalb die von Spradling und Rubin entwickelte Methode der P-Faktor-Transformation angewendet (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982). Mit Hilfe dieser Methode kann ein in vitro modifiziertes Gen in die Keimbahn von *Drosophila* integriert und seine Expression im transgenen Individuum über die gesamte Entwicklung verfolgt werden. Wenngleich diese Methode relativ zeit- und arbeitsaufwendig ist, so ermöglicht sie doch eine sehr wirklichkeitsgetreue und umfassende Analyse der Genregulation. Mit Ausnahme der homologen Rekombination, wie sie beispielsweise in Hefe angewandt wird (Scherer und Davis, 1979), für *Drosophila* aber bisher noch nicht entwickelt wurde, ist sie anderen Methoden hinsichtlich ihrer Aussagekraft weit überlegen. Für eine ganze Reihe verschiedener *Drosophila*-Gene konnten mit Hilfe der P-Faktor-Transformation *cis*-regulierende Elemente identifiziert werden.
Bevor weiter unten auf die Expression verschiedener ß3/lac-Konstrukte in transgenen Embryonen eingegangen wird, soll im nächsten Abschnitt zunächst auf die Expression des endogenen ß3-Tubulingens eingegangen werden. Die gezeigten immunhistochemischen Färbungen mit einem Antiserum gegen ß3-Tubulin (Leiss et al., 1988) wurden von D. Leiss durchgeführt und mir freundlicherweise zur vergleichenden Dokumentation überlassen.

4.2.2.1. Expression des ß3-Tubulingens

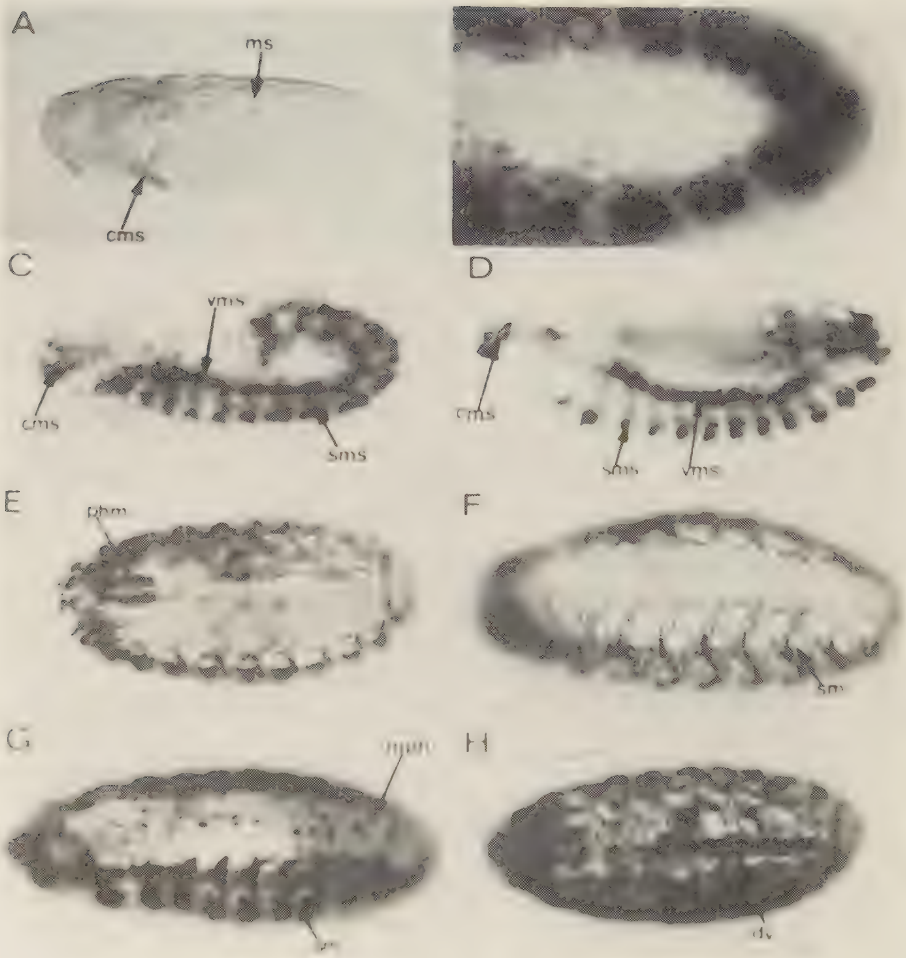
Wie aufgrund von *in situ*-Hybridisierungen an Schnitte von *Drosophila*-Embryonen bereits bekannt war, ist die Transkription des ß3-Tubulingens auf mesodermale Zellen, bzw. sich aus diesen Zellen entwickelnde Muskeln beschränkt (Gasch et al., 1988). Die Transkription des ß3-Tubulingens beginnt im Stadium 10 der Embryogenese zunächst in mesodermalen Zellen der Kopfsegmente. Kurze Zeit später findet man Transkription im gesamten Mesoderm des Embryos. Der dem Vorgang der sogenannten Keimstreifverkürzung folgende Differenzierungsprozeß des

Mesoderms in viszerale und somatische Muskulatur ist von einer fortwährenden Transkription des ß3-Tubulingens in diesen Derivaten begleitet. Ob andere sich aus dem Mesoderm entwickelnde Gewebe, wie die Herzmuskulatur, der Fettkörper oder die Makrophagen, ebenfalls ß3-mRNA akkumulieren, konnte durch die *in situ*-Hybridisierungen an Schnitte, wegen des geringen Auflösungsvermögens nicht beantwortet werden.
Um die Verteilung von ß3-Tubulin in verschiedenen Geweben genauer untersuchen zu können, wurde von Dagmar Leiss ein isotyp-spezifischer Antikörper hergestellt. Die Sequenz von drei der vier ß-Tubulingene von *Drosophila* war bekannt (Michiels et al., 1987; Rudolph et al., 1987). Obgleich die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sehr ähnlich sind (ß1/ß3: 90%; ß1/ß2: 95%), war auch bei ihnen die, zuerst von Sullivan und Cleveland (1986) beobachtete, Hypervariabilität der Sequenz am Carboxyterminus verschiedener ß-Tubuline zu erkennen. Die Sequenz ist in diesem Bereich so unterschiedlich, daß es erfolgversprechend schien, mit Hilfe synthetischer Peptide, Antikörper gegen alle drei Isotypen (ß1, ß2, ß3) zu erhalten. Dies schien zudem durch die Beobachtung von Breitling und Little (1986) sinnvoll, daß die carboxy-terminalen Domänen von Schweine-ß-Tubulinen für Antikörper in intakten Mikrotubuli zugänglich sind.
Mit Hilfe eines synthetischen Peptides gegen die 15 carboxy-terminalen Aminosäuren von ß3-Tubulin wurden isotyp-spezifische Antikörper erhalten, deren Spezifität gegen ß3-Tubulin mittels Elisa und Western blots demonstriert werden konnte (Leiss et al., 1988).
Wie schon weiter oben erwähnt, wurde das Antiserum nach Affinitätsanreicherung zur genaueren Untersuchung der ß3-Expressionsspezifität eingesetzt. Die hierzu durchgeführten immunhistochemischen Färbungen erlauben einen Nachweis des Antigens im intakten (fixierten) Embryo.
Im Einklang mit den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung findet man ß3-Tubulin in der Embryogenese zuerst in mesodermalen Zellen der Kopfsegmente (siehe Abb. 9A).
Kurze Zeit später erkennt man beidseitig (relativ zur dorso/ventral-Achse des Embryos) einzelne große Zellen im Mesoderm der thorakalen und abdominalen Segmente, die ß3-Tubulin exprimieren (siehe Abb. 9B). Im Vergleich zu anderen, unmarkierten Zellen im Mesoderm, zeichnen sich diese Zellen durch ihre ungewöhnliche Größe und ihre langen Fortsätze aus. Dies läßt vermuten, daß es sich bei ihnen um die zuerst beim Grashüpfer-Embryo beschriebenen Muskelpionierzellen handelt (Ho et al., 1983; Ball et al., 1985). Für diese, durch ihre Größe und ihre langen Fortsätze charakterisierten, Zellen konnte gezeigt werden, daß sie durch ihr typisches Wachstum und ihre Anheftung an die Apodeme (ektodermale Einstülpungen, die der Muskelanheftung dienen) ein Skelett für die sich später

entwickelnden Muskeln bilden. Es wurde spekuliert, daß der Entwicklung jedes Muskels das Erscheinen einer Muskelpionierzelle vorangeht. Kurze Zeit nach dem erstmaligen Auftreten der möglichen Muskelpionierzellen im *Drosophila*-Embryo, erkennt man eine Zunahme solcher ß3-Tubulin-exprimierender Zellen, so daß je Segmentanlage drei dieser Zellen auf jeder Seite des Embryos erkennbar sind. Möglicherweise handelt es sich dabei um Zellen mit Pionierfunktion für die dorsalen, pleuralen und ventralen Muskelgruppen.
Da sich kurze Zeit später (Abb. 9C), während des Zurückziehens des Keimstreifes, die Anzahl ß3-exprimierender Zellen drastisch erhöht, kann die weitere Entwicklung der Muskeln nur schwer verfolgt werden. Jedoch ist in diesem Stadium die Aufspaltung des Mesoderms in das äußere Somatopleura und das innere Splanchnopleura, die Vorläufer der somatischen bzw. viszeralen Muskulatur, sehr deutlich zu beobachten.
Die starke Expression von ß3-Tubulin in den Derivaten des Mesoderms läßt die weitere Differenzierung der Muskulatur erstmals bis in die späte Embryogenese verfolgen. So erkennt man Expression in der viszeralen Muskulatur entlang des Darmes und

Abb. 9 (Seite 60): Expression von ß3-Tubulin während der Embryogenese

Die hier gezeigten immunhistochemischen Färbungen mit einem Antiserum gegen ß3-Tubulin (Leiss et al., 1988) wurden von Dagmar Leiss durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die gezeigten Embryonen sind mit dem anterioren Ende nach links ausgerichtet. Stadien wurden nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985) bestimmt.
A: Horizontale Sicht eines Embryos im frühen Stadium 10. Beginn der ß3-Expression in mesodermalen Zellen der Kopfsegmente.
B: Ausschnitt eines von lateral aufgenommen Embryos im Stadium 11. Zu erkennen ist ß3-Expression in einzelnen große Zellen, den möglichen Muskelpionierzellen (siehe Text).
C: Laterale Sicht während des Zurückziehens des Keimstreifes (Stadium 12). Trennung des viszeralen und somatischen Mesoderms ist deutlich zu sehen.
D: Embryo im Stadium 14, mittsagittal. Starke Expression von ß3-Tubulin im somatischen, viszeralen und Kopf-Mesoderm.
E: Horizontale Sicht eines Embryos im Stadium 16. Färbung der ausdifferenzierten Pharynx-Muskulatur ist zu erkennen.
F: Ventrale Sicht eines Embryos im Stadium 16. ß3-Tubulin findet sich auch in der voll-ausdifferenzierten somatischen Muskulatur. Zu sehen sind die ventralen, teilweise auch die pleuralen Anteile der Muskulatur.
G: Embryo im Stadium 15, ventrale Sicht. Makrophagen exprimieren ebenfalls ß3-Tubulin.
H: Dorsale Sicht eines Embryos im Stadium 16. Auch in Zellen der Herzmuskulatur läßt sich ß3-Tubulin nachweisen.
Abkürzungen: (cms) Mesoderm der Kopfsegmentanlagen, (dv) Herzmuskulatur, (mph) Makrophagen, (ms) Mesoderm der thorakalen und abdominalen Segmentanlagen, (phm) Pharynxmuskulatur, (sm) somatische Muskulatur, (sms) somatisches Mesoderm, (vm) viszerale Muskulatur, (vms) viszerales Mesoderm


A
ms
cms
C
vms
cms
sms
D
cms
sms
vms
E
pbm
F
G
H

der äußeren somatischen Muskulatur (Abb. 9D und 17A). Auch in der ausdifferenzierten larvalen Muskulatur, der Pharynxmuskulatur im Bereich des Kopfes (Abb. 9E) und der somatischen Muskulatur im Bereich des Rumpfes (Abb. 9F) sind noch große Mengen von ß3-Tubulin enthalten.
Zusätzlich erkennt man ventral einzelne durch den Antikörper markierte Zellen (Abb. 9G), bei denen es sich wahrscheinlich um Makrophagen handelt. Makrophagen entstehen ebenfalls aus dem Mesoderm und tauchen bevorzugt in Regionen auf, in denen Zell-Tod auftritt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985).
Während des Vorgangs der "dorsal closure" erkennt man lateral zwei Reihen sogenannter Cardioblasten aufeinanderzuwandern, so daß sie sich im Stadium 16 mittsagittal aneinanderreihen, um das dorsale Gefäß, die Herzmuskulatur, zu bilden. Die Zellen der Herzmuskulatur zeigen ebenfalls starke Expression von ß3-Tubulin (siehe Abb. 9H).
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle im Embryo erkennbaren, sich aus dem Mesoderm entwickelnden, Gewebetypen ß3-Tubulin exprimieren. Der Fettkörper spielt hier insofern eine Ausnahme, da er im Embryo sehr schwer erkennbar ist. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß der larvale Fettkörper ß3-Tubulin enthält (D. Leiss, R. Renkawitz-Pohl und M. Bate, persönliche Mitteilung). Hinweise darauf, daß das ß3-Tubulingen, zwar überwiegend, doch möglicherweise nicht ausschließlich in mesodermalen Derivaten exprimiert ist, wurden aus der weiter unten beschriebenen Analyse der ß3-Expression in dorsalisierten Mutanten erhalten (siehe Abschnitt 4.2.2.4.).
Die in den folgenden Abschnitten geschilderten Ergebnisse beschäftigen sich mit dem Eingrenzen regulativer Domänen des ß3-Tubulingens und verstehen sich als Ausgangspunkt für die Definition *cis*-agierender Elemente, die für die korrekte Expression dieses Gens verantwortlich sind. Dies schien von großem Interesse, da das Verständnis der hierarchischen Genaktivierung in der dorso/ventral-Achse während der frühen *Drosophila*-Entwicklung noch am Anfang steht. Bezüglich der Determination des Mesoderms scheint verschiedenen, maternal und zygotisch exprimierten Genen, wie *dorsal*, *twist* und *snail*, eine Schlüsselrolle zuzukommen (Levine, 1988; Anderson, 1987). Völlig ungeklärt ist jedoch, wie und wann nach Beginn der Gastrulation eine Determination der mesodermalen Zellen in unterschiedliche Entwicklungsrichtungen erfolgt. Während der frühen Gastrulation ist das mesodermale Schicksal dieser Zellen festgelegt, nicht jedoch die Determination für ein bestimmtes mesodermales Gewebe (Technau, 1987). Analyse der Regulation des ß3-Tubulingens sollte somit die Frage beantworten: Wird die ß3-Expression in den verschiedenen mesodermalen Geweben auf DNA-Ebene durch unterschiedliche Elemente reguliert? Wenn dies der

Fall wäre, sollte sich die Regulation des ß3-Tubulingens als ausgezeichnetes Modellsystem für das Verständnis der hierarchischen Genaktivierung im Mesoderm erweisen.

4.2.2.2. Nachweis *cis*-regulierender Sequenzen im 5´-benachbarten Bereich des ß3-Tubulingens

4.2.2.2.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Genen mit Fusion im 5´-untranslatierten Bereich des ß3-Tubulingens und Klonierung in den pW8-Vektor

Um die Klonierung der in Abbildung 7 gezeigten ß3/*lacZ*-Fusionsgene in einen P-Element-Vektor zu erleichtern, wurde das ebenfalls in Abbildung 7 gezeigte Plasmid pUClac18 folgendermaßen modifiziert: Nach EcoRI-Partialspaltung wurde das ca. 4,6 kb große Fragment (es enthält den Polylinker, das *lacZ*-Gen und das SV40-Polyadenylierungssignal) mit EcoRI geöffnetem pUC19 ligiert. Das so erhaltene Plamid pUClac20 enthält das *lacZ*-Gen und das SV40-Polyadenylierungssignal flankiert von Polylinkersequenzen am 5´- und am 3´-Ende (siehe Abb. 10). Dieses Plasmid diente als Ausgangspunkt für die Fusionen der ß3-Promotordeletionen mit dem *lacZ*-Gen im pW8-Vektor (Klemenz et al., 1987). Dieser Vektor, der mir freundlicherweise von R. Klemenz vor der Publikation zur Verfügung gestellt wurde, erleichtert die Identifizierung und Homozygotisierung transformierter Fliegen erheblich. Für die Selektion transformierter Fliegen enthält er ein *white*-Gen, daß durch den *hsp70*-Promoter reguliert wird. Heterozygot transformierte *white*-Fliegen haben meist orangefarbene Augen (*white*-Fliegen besitzen weiße Augen), homozygot transformierte Fliegen hingegen rote Augen. Darin besteht zugleich der größte

Abb. 10 (Seite 63): Konstruktion von pUClac2O und Insertion von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen in den P-Element-Vektor pW8

Die Karte des pW8-Vektors wurde nach Klemenz et al., (1987) erstellt. Angegeben sind nur die Restriktionsschnittstellen im Polylinker. Durch Pfeilspitzen sind die, in gegensinniger Anordnung, an den Enden des P-Elements vorliegenden Sequenzwiederholungen (31 bp) hervorgehoben.
Zur Konstruktion von pUClac20 wurde das 4,5 kb große EcoRI-Fragment nach partieller Spaltung von pUClac18 (siehe Abb. 7) präparativ isoliert und in mit EcoRI linearisierten pUC19 ligiert. Angegebene Restriktionsenzyme schneiden nur an den gezeigten Positionen.
Insertion der ß3/*lacZ*-Fusionsgene in den pW8-Vektor erfolgte für alle Deletionen auf gleichartige Weise. Das, die ß3-Deletion beinhaltende, EcoRI/HindIII-Fragment wurde zunächst aus den in Abbildung 7 gezeigten Fusionsgenen isoliert und dann mit dem 4,5 kb großen HindIII/XbaI-Fragment von pUClac20 in,durch EcoRI/HindIII-Spaltung geöffneten, pW8-Vektor ligiert. Gezeigt sind nur in den Polylinkern enthaltene, bzw. für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen.

1 kb
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
HindIII
ATG
lacZ
SV40
HpaI (3x)
XhoI
StuI
PstI
SphI
hsp 70
white
pUC8
B3/lac-0.03
B3/lac-0.08
B3/lac-0.23
B3/lac-1.2
B3/lac-6.0
pUC19
pUClac20
pW8
ClaI
NotI
SfII
SpeI

Vorteil dieses Vektors, da die Identifikation transformierter Fliegen mit den herkömlichen Selektionssystemen *neo* und *rosy* großer Erfahrung bedarf und die Homozygotisierung sehr arbeitsaufwendig ist. Heterozygot und homozygot transformierte Fliegen sind mit diesen Selektionssystemen nicht zu unterscheiden, wodurch erst nach Einkreuzen von Balancerchromosomen ein Stamm stabil gehalten werden kann.
Die fünf verschiedenen ß3-Promotordeletionen wurden aus den in Abb. 7 gezeigten Fusionsgenen als EcoRI/HindIII-Fragmente isoliert. In einer Dreifachligation wurden diese Fragmente dann mit dem 4,5 kb großen HindIII/XbaI-Fragment von pUClac20 in EcoRI/XbaI-geöffneten pW8 kloniert. Die so erhaltenen rekombinanten Plasmide sind in Abbildung 10 dargestellt.
Für jedes der in dieser Abbildung dargestellten Konstrukte wurden mindestens vier unabhängig transformierte Fliegen erhalten. Soweit die Insertion nicht homozygot lethal war, wurde aus jeder dieser Fliegen ein, bezüglich des Inserts, homozygoter Stamm hergestellt (eine Auflistung dieser Stämme gibt Tabelle 2). Embryonen der verschiedenen Stämme wurden dann auf ß-Galaktosidase-Expression hin untersucht.

Stamm	Konstrukt	Stamm	Konstrukt
F.14.1	pW/ß3/lac-0,03	B.14.2	pW/ß3/lac-1,2
F.34.1.1		B.50.1	
F.34.1.3		B.50.3	
F.35.1		B.50.7	
F.37.1		B.51.1	
		B.55.1	
E.2.1	pW/ß3/lac-0,08	B.57.1	
E.9.1		B.68.2	
E.10.1		B.72.2	
E.11.1		B.77.1	
E.20.1			
E.22.1		A.16.2	pW/ß3/lac-6,0
E.25.1		A.34.1	
		A.36.1	
D.10.9	pW/ß3/lac-0,23	A.39.1	
D.10.4		A.44.1	
D.16.1		A.45.1	
D.16.2		A.55.1	

Tabelle 2: Aufstellung der transformierten Stämme mit Fusion zwischen ß3-Tubulingen und *lacZ*-Gen im 5´-untranslatierten Bereich (vgl. Abb.10)

4.2.2.2.2. Nachweis "genereller" *cis*-agierender Elemente in der Nähe des Transkriptionsstarts

Nach Analyse der für die kürzeren Fusionsgene (Endpunkte der Deletion zwischen -0,03 und -1,2) transgenen Embryonen, ergab sich zunächst ein sehr komplexes Bild. Die meisten dieser Stämme exprimierten ß-Galaktosidase (diejenigen mit der Deletion bis -0,03 allerdings deutlich schwächer). Die gewebespezifische Verteilung wies jedoch in keinem Fall erkennbare Gemeinsamkeiten zu der des endogenen ß3-Tubulins auf. Statt dessen exprimierten die meisten Linien ß-Galaktosidase in den verschiedensten Geweben aller drei Keimblätter. Außer einer leichten Präferenz für neuronale Expression, konnten zwischen den verschiedenen Linien keine Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster erkannt werden. Dies galt auch bei Vergleich der verschiedenen Stämme mit der gleichen Deletion. Zwei willkürlich herausgegriffene Beispiele sollen dies belegen. In Abbildung 11 sind zwei, mit dem gleichen Konstrukt

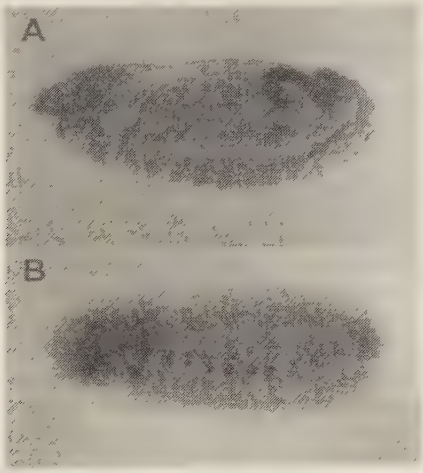


Abb. 11: Starke Positionseffekte bestimmen die Expression der kürzeren Fusionsgene

Zwei Beispiele für die extremen Positionseffekte auf die Expression der kürzeren Fusionsgene (ß3/lac-0,03, -0,08, -0,23 und -1,2): Gezeigt sind Embryonen zweier, mit dem gleichen Konstrukt (pW/ß3/lac-0,23), aber unabhängig voneinander transformierter Linien. Gefärbt wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen ß-Galaktosidase (Promega) und dem "Vectastain ABC Kit" (Vector Laboratories).
A: Embryonen des Stammes D.16.1 zeigen starke Expression von ß-Galaktosidase im Hinterdarm.
B: Die Linie D.16.2 zeigt Expression in Zellen des peripheren Nervensystems.

(pW/ß3/lac-0,23), jedoch durch unabhängige Ereignisse transformierte, Embryonen gezeigt. Während die Linie D.16.1 (Abb. 11A) ß-Galaktosidase nur im Hinterdarm exprimiert, zeigt die Linie D.16.2 Expression nur in Zellen, die wahrscheinlich dem peripheren Nervensystem zuzuordnen sind (Abb 11B).
Festgehalten werden kann also, daß der Bereich des ß3-Tubulingens zwischen -1,2 kb und +0,12 kb keine, zumindest nicht mit der angewandten Methode erfaßbaren, Elemente enthält, die für die mesodermale Expression im Embryo verantwortlich sind. Die Exprimierbarkeit der eingebrachten Fusionsgene zeigt jedoch, daß in diesem Bereich Elemente enthalten sein müssen, die für eine Transkription ausreichend sind. Aus den Experimenten mittels transienter Expression (siehe Abschnitt 4.2.1.2.) war übereinstimmend bekannt, daß diese Promotoranteile zur korrekten Initiation der Transkription ausreichend sind. Die völlige Reprimierbarkeit bzw. Aktivierbarkeit in den verschiedensten Geweben spricht für eine extreme Beeinflußbarkeit dieser "generellen" Elemente durch reprimierende bzw. aktivierende Elemente in der jeweiligen genomischen Nachbarschaft.
Zusammenfassend läßt sich bis hierher folgendes festhalten: Der zwischen -1,2 kb und +0,12 kb enthaltene Promotoranteil scheint für mehr oder minder konstitutive Expression verantwortliche Elemente zu enthalten. Die beobachteten gewebespezifischen Muster der ß-Galaktosidase-Expression werden jedoch vermutlich durch Elemente in der genomischen Nachbarschaft reguliert.

4.2.2.2.3. Lokalisierung eines für die Expression in der somatischen und Herzmuskulatur notwendigen Bereiches zwischen -1,2 und -6,0 kb

Ein grundsätzlich anderes Bild ergab sich beim Betrachten der Embryonen, die mit einem längeren Fusionsgen (Endpunkt der Deletion bei -6,0 kb) transformiert waren. Die, für die kürzeren Konstrukte beobachteten, starken Positionseffekte waren bei sieben voneinander unabhängig transformierten Linien nicht mehr zu beobachten. Statt dessen war in jedem dieser Stämme starke Expression von ß-Galaktosidase in der somatischen und der Herzmuskulatur erkennbar (siehe Abb. 12A,B). Im Unterschied zur ß3-Tubulinexpression war jedoch keine ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur vorhanden (siehe Abb. 12C). Bis auf die fehlende Expression in der viszeralen Muskulatur war das beobachtete Expressionsmuster dem des endogenen ß3-Tubulins sehr ähnlich. Es sollte vielleicht noch hinzugefügt werden, daß eine bei einzelnen Stämmen auftretende schwache Falschexpression von ß-Galaktosidase z.B. im Hinterdarm ein häufiger zu beobachtendes

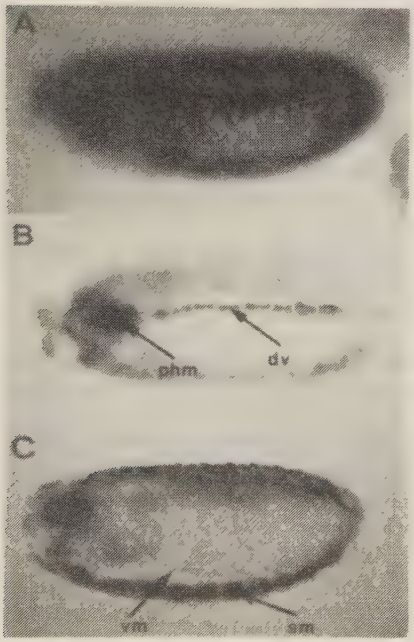


Abb. 12: Sequenzen zwischen -1,2 kb und -6,0 kb dirigieren Expression in der somatischen und der Herzmuskulatur, nicht aber der viszeralen Muskulatur

Die Abbildung zeigt Embryonen des Stammes A.16.2, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen ß-Galaktosidase (Promega) gefärbt wurden. Embryonen sind mit dem anterioren Ende nach links ausgerichtet. Stadien wurden nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985) festgelegt.
A: Laterale Sicht eines Embryos im Stadium 16. Expression von ß-Galaktosidase in der somatischen Muskulatur ist deutlich zu sehen.
B: Zellen der Herz- und der Pharynxmuskulatur zeigen ebenfalls ß-Galaktosidase-Expression (dorsale Sicht, Stadium 17).
C: Im Vergleich zur ß3-Expression (vgl Abb. 9D und 17A) läßt sich keine Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur beobachten. Dies läßt sich am besten bei Betrachtung von dorsolateral, wie in dieser Abbildung für einen Embryo im Stadium 15, demonstrieren.
Abkürzungen: (dv) Herzmuskulatur, (phm) Pharynxmuskulatur, (sm) somatische Muskulatur, (vm) viszerale Muskulatur

Phänomen bei Verwendung des *lacZ*-Gens als Indikatorgen ist (siehe z.B. DiNardo et al., 1988).
Jedenfalls scheint mit 6 kb 5´-benachbarter Sequenzen die Sensitivität gegenüber genomisch benachbarten Sequenzen stark vermindert. Dies könnte durch einen unspezifischen Puffereffekt der Sequenzen zwischen -6,0 kb und -1,2 kb erklärt werden. Man könnte in dieser Region jedoch auch eine Anheftungsstelle zur Kernmatrix vermuten, deren Funktion möglicherweise in der Abgrenzung von genomisch benachbarten Gendomänen liegt (siehe Abschnitt 5.2.2.).
Festhalten läßt sich, daß zwischen -6,0 kb und -1,2 kb zumindest ein regulierendes Element liegen muß, daß die ß3-Expression in der somatischen- und der Herzmuskulatur lenkt. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Suche nach dem für die Expression in der viszeralen Muskulatur verantwortlichen Element, das außerhalb des bis hier untersuchten Bereichs liegen muß.

4.2.2.3. Nachweis *cis*-regulierender Sequenzen im ersten Intron des ß3-Tubulingens

Zwei Gründe sprachen dafür nach dem für die Expression in der viszeralen Muskulatur verantwortlichen Element 3´ vom Transkriptionsstart zu suchen. Zum einen stellte das mögliche Vorhandensein einer Anheftungsstelle zur Kernmatrix (SAR) zwischen -1,2 und -6,0 kb die Existenz eines solchen Elementes jenseits dieses SARs in Frage (eine mögliche Funktion der SARs besteht in der Abgrenzung zu benachbarten Genen und den sie regulierenden Elementen, siehe Abschnitt 5.2.2.). Zum anderen bot sich das im Vergleich zu anderen *Drosophila*-Genen relativ große erste Intron (4,5 kb) des ß3-Tubulingens für die Suche nach einem solchen Element an (siehe Abschnitt 5.1.1.). Da dieses Intron zwischen den Kodons für Aminosäure 19 und 20 liegt, wurde die Fusion zum *lacZ*-Gen im aminosäurekodierenden Bereich des ß3-Tubulingens hinter dem Kodon für Aminosäure 23 durchgeführt.

4.2.2.3.1. Konstruktion von ß3/*lacZ*-Genen mit Fusion im aminosäurekodierenden Bereich des ß3-Tubulingens und Klonierung in den pW8-Vektor

Für eine Fusion von ß3-Tubulin- und *lacZ*-Gen im Leseraster, bot sich der von Shapira et al. (1983) entwickelte Vektor pMC1871 an, der einen Polylinker vor dem Kodon für Aminosäure 9 von ß-Galaktosidase enthält. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Verknüpfung im zweiten Exon des ß3-Tubulingens, um eine mögliche Beteiligung des ersten Introns (zwischen den Kodons für Aminosäure 19 und 20) an der Regulation nachweisen zu können.

Die Fusion erfolgte hinter dem Kodon 23 des ß3-Tubulingens über die SmaI-Schnittstelle im Polylinker von pMC1871. Fusioniert wurde an dieser Stelle nicht nur ein genomischer (Abb. 13), sondern auch ein cDNA-Klon (Abb. 14), der an der PstI-Schnittstelle im Kodon für Aminosäure 8 wieder an genomische Sequenzen gekoppelt wurde (zur ausführlichen Beschreibung der Klonierung siehe Text zu Abb. 13 und 14). Dies führte zu den beiden Konstrukten pW/ß3/lac-6,0I (mit Intron) und pW/ß3/lac-6,0c (ohne Intron). Die beiden Konstrukte enthalten 6 kb 5´-benachbarter Sequenzen, die im zweiten Exon, unter Beibehaltung des Leserasters (die Sequenz der Fusionsstelle zeigt Abb. 15), an das *lac*Z-Gen (mitsamt SV40-Polyadenylierungssignalen) fusioniert sind. Sie unterscheiden sich lediglich durch An- oder Abwesenheit des 4,5 kb großen Introns. Transkription beider Fusionsgene sollte somit zur Bildung der gleichen mRNA führen, womit ein möglicher Einfluß des Introns auf die Expression durch Vergleich der Expressionsmuster direkt gezeigt werden kann.
Um zudem entscheiden zu können, ob ein möglicher Einfluß des Introns auf die Expression des Indikatorgens auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wurde der größte Teil des Introns zusätzlich hinter die SV40-Polyadenylierungsstelle in pW/ß3/lac-6,0c kloniert. Das resultierende Konstrukt pW/ß3/lac-6,0cDI, sowie eine Beschreibung der Konstruktion zeigt Abbildung 16.

EcoRI
ATG
SmaI
BamHI
lacZ
SV40
hsp 70
white
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
HpaI (3x)
XhoI
StuI
XhoI
SalI
PstI
SphI
pUC8
pW/83/ac-6.01
HindIII
SalI
SmaI
BamHI
SacI
EcoRI
pUC19
pTu60I-3
HindIII
SphI
PstI
SalI
BamHI
SmaI
KpnI
SacI
EcoRI
pUC18
pTu60I-2
HindIII
SphI
PstI
SalI
XbaI
BamHI
SmaI
KpnI
SacI
EcoRI
pUC18
pTu60I-1
EcoRI
1 kb
ATG
HindIII
SalI
BamHI
Sau3A
63-Tubulingen
PstI
SalI
BamHI
EcoRI
SmaI
BamHI
ClaI
lacZ
SacI
BamHI
SalI
PstI
pBR322
pMC1871
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
ATG
ClaI
lacZ
SacI
SV40
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
pUC19
pUClac20

Abb. 13 (Seite 70): Konstruktion von pW/ß3/lac-6,0I

Zur Konstruktion von pTu60I-1 wurde das 130 bp lange BamHI/PstI-Fragment aus pTu60 isoliert (BamHI schneidet 58 bp in 5´-Richtung vom zweiten Exon und PstI im Kodon für Aminosäure 43). Das durch Nachschneiden mit Sau3A erhaltene Fragment von 66 bp Länge wurde dann in BamHI-linearisierten pUC18 kloniert.
Aus pTu60I-1 wurde dann das ca. 70 bp lange BamHI/SmaI-Fragment (durch die Ligierung eines Sau3A-Endes mit einem BamHI-Ende wurde die in der Abbildung rechte BamHI-Schnittstelle im Vektor zerstört) mit dem 360 bp langen BamHI/SalI-Fragment aus pTu60 in SalI/SmaI-geöffneten pUC18 ligiert. Dies führte zum Klon pTu60I-2.
Durch Spaltung von pTu60-5 mit SalI und SacI wurde das kleine Fragment im Polylinker entfernt. In einer Dreifachligation wurden in diesen Subklon dann das 430 bp lange SalI/SmaI-Fragment aus pTu60I-2 und das 1,9 kb lange SmaI/SacI-Fragment aus pMC1871 eingeführt. Das resultierende Konstrukt wurde pTu60I-3 genannt. Es enthält ca. 4,0 kb genomischer Sequenzen des ß3-Tubulingens, zwischen der HindIII-Schnittstelle (bei ca +900) und der Sau3A-Schnittstelle (hinter dem Kodon für Aminosäure 23), und 1,9 kb des *lacZ*-Gens aus pMC1871. Bei der Fusion zwischen ß3-Tubulingen und *lacZ*-Gen wurde darauf geachtet, daß keine Verschiebung der jeweiligen Leseraster auftreten sollte. Dies wurde durch die in Abb. 15 gezeigte Sequenzanalyse im Fusionsbereich bestätigt.
Gleichzeitige Ligation vier verschiedener Fragmente führte schließlich zu dem unten dargestellten Konstrukt pW/ß3/lac-6,0I. Ligiert wurden dazu das 7 kb große EcoRI/HindIII-Fragment aus pTu60-9, das 4,8 kb große HindIII/ClaI-Fragment aus pTu60I-3, das 3,3 kb große ClaI/XbaI-Fragment aus pUClac20 und XbaI/EcoRI-geöffneter pW8.
Gezeigt sind Restriktionsschnittstellen nur im Bereich der Polylinker und soweit sie für das Verständnis der Klonierung wichtig erschienen.

Abb. 14 (Seite 72): Konstruktion von pW/ß3/lac-6,0c

Aus dem ß3-cDNA-Klon pc60-1 (siehe Gasch et al., 1988) wurde zunächst das 106 bp lange PstI-Fragment präparativ isoliert (dies entspricht dem Bereich zwischen den Kodons für Aminosäure 8 und 43). Das durch Nachschneiden mit Sau3A erhaltene PstI/Sau3A-Fragment von 43 bp Länge wurde dann in PstI/BamHI-geöffneten pUC18 ligiert. Dies führte zum Subklon pTu60c-1.
Das 1,8 kb große PstI/ScaI-Fragment aus pTu60c-1 wurde dann mit dem 1,4 kb großen PstI/ScaI-Fragment von pTu60-8 ligiert. In dem resultierenden Konstrukt pTu60c-2 sind genomische- mit cDNA-Sequenzen an äquivalenter Position verknüpft.
Die Fusion von cDNA- an *lacZ*-Sequenzen im Leseraster wurde dann durch Ligation dreier Fragmente erreicht. Verknüpft sind im Konstrukt pTu60c-3 das 450 bp lange BamHI/SmaI-Fragment aus pTu60c-2 und das 1,9 kb lange SmaI/SacI-Fragment aus pMC1871 in pUC19, der mit BamHI und SacI gespalten war.
Drei Fragmente wurden dann zur Konstruktion von pW/ß3/lac-6,0c aneinanderligiert. Dazu wurde das, durch partielle BamHI-Spaltung und Nachspalten mit ClaI isolierte, 1,3 kb große Fragment aus pTu60c-3 mit dem 3,3 kb großen ClaI/XbaI-Fragment aus pUClac20 und dem ca. 14 kb langen BamHI/XbaI-Fragment von pW/ß3/lac-6,0 ligiert (um vor der Isolierung des letzteren Fragmentes vollständige Spaltung im Linker zu gewährleisten, wurde zunächst mit XbaI und dann mit BamHI inkubiert).
Gezeigt sind Restriktionsschnittstellen nur im Bereich der Polylinker und soweit sie für das Verständnis der Klonierung wichtig erschienen.

EcoRI
ATG
SmaI
BamHI
lacZ
SV40
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
HpaI (3x)
XhoI
StuI
XhoI
SalI
PstI
SphI
hsp 70
white
pUC8
pW/B3/lac-8.0c
HindIII
SphI
PstI
SalI
XbaI
BamHI
ATG
SmaI
BamHI
SacI
EcoRI
pUC18
pTu60c-3
EcoRI
SacI
SmaI
BamHI
ATG
PstI
SmaI
SacI
EcoRI
pUC18
ScaI
pUC19
pTu60c-2
HindIII
SphI
PstI
SmaI
SacI
EcoRI
pUC18
pTu60c-1
EcoRI
ATG
PstI
Sau3A
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
pUC19
pc60-1
EcoRI
BamHI
ATG
PstI
Sau3A
B3-Tubulingen
1 kb
PstI
SalI
ClaI
SacI
lacZ
BamHI
SalI
PstI
pBR322
pMC1871
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
ATG
ClaI
SacI
lacZ
SV40
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
pUC19
pUClac2Ø

A

```
GGAATTTGCTAATTGGTTTAATAGACTCGAGCTTGAGAAACTCAAACTAAT

TACTTCTAATCAAACGAGTTTTTTACTTTTATTCAATAAATATGACTTTAT

TGTATATGCAATTCGAAAGAGTTATCATTCTAGGATCCAGCTTTGAGTACA

ACTTCCTAACACACTTCCTAACCTTTTGCTTTCCCGCAGTTCTGGGAGATC
_____ ß3 _____                  _____ lacZ _____
TTC TGG GAG ATC CCC GGG GAT CCC GTC GTT TTA CAA CGT
Phe Trp Glu Ile Pro Gly Asp Pro Val Val Leu Gln Arg
```

B

```
GAGTGCGATCGGCCGTCTCGCTCTGGCCGCAGCGTCGGCACTCGAGTCGCA

GTCGACTCAAAGTCACCAGAACATCGTCGACGGACTCGAGTTTTGTTCCGC

CGATCAGTTGTGTCTTGTGCGTTGTGCGGTGAAGTTGCGCCTTCGTTCTGA

AACCTAATAAGCTGAGAATCAGAACCTCTGGACATCTGAACGTCTGAAAAT

CCAGCAGCAGCTACTCGGACCGTGCGGTGCATCCTTCTCCAGACTGAGACT

AAGATCCGATTCCAGCCTTAGCCTTCGACCCCACAAATCGCCGCTTTCAAG
_____________________________________________________
ATG AGA GAA ATC GTG CAC CTG CAG GCC GGC CAG TGC GGC
Met Arg Glu Ile Val His Leu Gln Ala Gly Gln Cys Gly
_____________________ß3 ____________________________
AAC CAA ATC GGC GCT AAG TTC TGG GAG ATC CCC GGG GAT
Asn Gln Ile Gly Ala Lys Phe Trp Glu Ile Pro Gly Asp
    _____________ lacZ _____________________________
CCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAC CCT GGC
Pro Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly
```

Abb. 15: Sequenz im Bereich der Fusionsstelle von pW/ß3/lac-6,0I und pW/ß3/lac-6,0c

Anhand der bekannten Sequenzen am 3´-Ende des ersten Introns (sie wurden von U. Hinz bestimmt) und des Promotors des ß3-Tubulingens (siehe Abb. 6) wurden synthetische Oligonukleotide hergestellt (unterstrichen in A und B) die für die Sequenzanalyse eingesetzt wurden.
A: Sequenz von pW/ß3/lac-6,0I: Durch einen Strich sind die Kodons hervorgehoben, die für ß3-Tubulin (As 20 - 23, siehe Rudolph et al., 1987) bzw. ß-Galaktosidase (As 9 - 13, siehe Kalnis et al., 1983) kodieren.
B: Sequenz von pW/ß3/lac-6,0c: Markiert sind Kodons für ß3-Tubulin (As 1 - 23, vgl. A und Abb. 6 zur Position des 4,5 kb großen Introns zwischen Kodon 19 und 20) und ß-Galaktosidase (As 9 - 20)

Abb. 16 (Seite 74): Konstruktion von pW/ß3/lac-6,0cDI

Zur Konstruktion von pW/ß3/lac-6,0cDI wurde das 4,3 kb große XmaIII(+305)/BglII(+4600)-Fragment aus pW/ß3/lac-6,0I präparativ isoliert. Nach Auffüllen der Enden wurde das Fragment dann in mit XbaI linearisierten und aufgefüllten pW/ß3/lac-6,0c kloniert. Das Konstrukt pW/ß3/lac-6,0cDI besitzt das Intron-Fragment in gleicher relativer Orientierung zum Transkriptionsstart wie das ß3-Tubulingen. Die gegensätzliche Orientierung war trotz mehrerer unabhängiger Versuche nicht klonierbar.
Gezeigt sind in dieser Abbildung Restriktionsschnittstellen im Bereich der Poylinker und solche, die für die Klonierung relevant waren.

EcoRI
ATG
SmaI
BamHI
lacZ
SV40
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
SalI
HpaI (3x)
XhoI
StuI
XhoI
SalI
PstI
SphI
hsp 70
white
pUC8
pW/B3/lac-6.0cDI
EcoRI
ATG
SmaI
BamHI
lacZ
SV40
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
HpaI (3x)
XhoI
StuI
XhoI
SalI
PstI
SphI
hsp 70
white
pUC8
pW/B3/lac-6.0c
EcoRI
ATG
XmaIII
BglII
B3-Tubulingen
1 kb

4.2.2.3.2. Lokalisierung eines für die Expression in der viszeralen Muskulatur notwendigen gewebespezifischen "Enhancer"-Elementes im ersten Intron des ß3-Tubulingens

Für das Konstrukt pW/ß3/lac-6,0I, in dem das 4,5 kb große Intron des ß3-Tubulingens enthalten ist, wurden insgesamt fünf transgene Stämme erhalten (siehe Tabelle 3). Embryonen dieser Stämme zeigten positionsunabhängige Expression von ß-Galaktosidase in der somatischen- und der Herzmuskulatur und, wie man in Abbildung 17B erkennt, zusätzlich in der viszeralen Muskulatur. Dies wird aus einem Vergleich zu Abb. 17A deutlich, in der die Expression von ß3-Tubulin gezeigt ist. Die gegenüber dem in Abb. 12C gezeigten Embryo zusätzlich enthaltenen Sequenzen des ß3-Tubulingens (zwischen +116 im 5´-untranslatierten Bereich und dem Kodon für Aminosäure 23 im zweiten Exon) bewirken also die Expression in der viszeralen Muskulatur.

Stamm	Konstrukt
A.I.15.1	pW/ß3/lac-6,0I
A.I.28.1	
A.I.40.1	
A.I.51.2	
A.I.145.1	
A.c.8.1	pW/ß3/lac-6,0c
A.c.92.1	
A.c.93.1	
A.c.94.1	
A.c.D.I.35.1	pW/ß3/lac-6,0cDI
A.c.D.I.68.1	
A.c.D.I.77.1	

Tabelle 3: Aufstellung der transformierten Stämme mit Fusion zwischen ß3-Tubulingen und *lacZ*-Gen im aminosäurekodierenden Bereich (vgl. Abb. 13, 14, 16)

Zur Beantwortung der Frage, ob die Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur auf die Anwesenheit des Introns oder aber zusätzlicher Sequenzen der ß3-mRNA zurückzuführen ist, diente das Konstrukt pW/ß3/lac-6,0c, bei dem im Vergleich zu ß3/lac/-6,0I das Intron exakt deletiert ist. Keine der vier für dieses Konstrukt transgenen Linien (siehe Tabelle 3) zeigte Expression in der viszeralen Muskulatur (Abb. 17C). Da, wie schon erwähnt, in beiden Fällen die gleiche mRNA vorhanden sein sollte, kann ein Effekt auf translationeller Ebene ausgeschloßen werden. Der Vergleich der Expressionsmuster von pW/ß3/lac-6,0 und

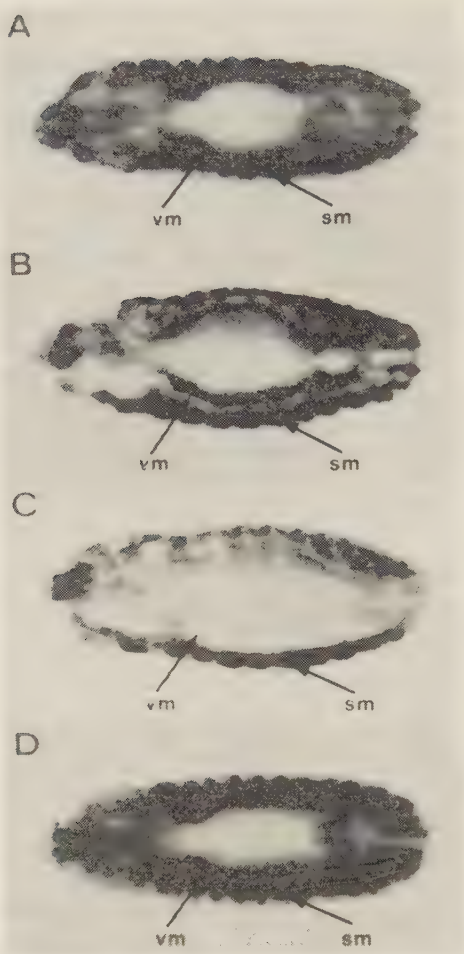


Abb. 17: Das große Intron des ß3-Tubulingens ist für die Expression in der viszeralen Muskulatur notwendig

Horizontale Sicht von Embryonen im Stadium 15 (nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Die gezeigten Embryonen sind mit dem anterioren Ende nach links ausgerichtet.
A: Expression von ß3-Tubulin in einem Wildtyp-Embryo. Die Färbung wurde mit dem Antiserum gegen ß3-Tubulin (Leiss et al., 1988) durchgeführt.
B: Expression von pW/ß3/lac-6,0I. Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen ß-Galaktosidase (Promega).
C: Expression von pW/ß3/lac-6,0c. Färbung wie in B. Die Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur fehlt (vgl. A und B).
D: Expression von pW/ß3/lac-6,0cDI. Färbung wie in B. Deutliche Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur.
Abkürzungen: (sm) somatische Muskulatur, (vm) viszerale Muskulatur

pW/ß3/lac-6,0c (vgl. Abb 12C und 17C) schließt einen Einfluß der der mRNA-Sequenzen zwischen +116 und dem Kodon für Aminosäure 23 auf die Transkription zusätzlich aus. Die Anwesenheit des Introns scheint also für die Expression in der viszeralen Muskulatur notwendig zu sein. Ob dies jedoch auf der Ebene der Transkription, des "Splicing" oder auch des intrazellulären Transports geregelt wird, konnte aus den bis hier geschilderten Experimenten nicht beantwortet werden.
Zur Klärung dieser Frage diente die durch pW/ß3/lac-6,0cDI vermittelte ß-Galaktosidase-Expression. In diesem Konstrukt befindet sich der größte Teil des Introns hinter der SV40-Polyadenylierungsstelle (von pW/ß3/lac-6,0c) und sollte daher nicht im Transkript enthalten sein (zur Konstruktion siehe Abb. 16). Bei einer Regulation auf posttranskriptioneller Ebene sollte keine Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur zu finden sein. Bei Regulation auf transkriptioneller Ebene durch ein im Intron enthaltenes "Enhancer"-Element sollte hingegen Expression in der viszeralen Muskulatur feststellbar sein. Für dieses Konstrukt wurden drei voneinander unabhängig transformierte Stämme erhalten (siehe Tabelle 3). Alle zeigen übereinstimmend das vollständige ß3-Expressionsmuster, also auch die Expression in der viszeralen Muskulatur (Abb. 17D).
Dieses Ergebnis beweist eine Regulation durch im Intron erhaltene Sequenzen auf der Ebene der Transkription und schließt einen Einfluß auf posttranskriptioneller Ebene aus. Die Funktion dieser Sequenzen sowohl innerhalb, als auch hinter dem Fusionsgen legt die Anwesenheit eines gewebespezifischen "Enhancer"-Elementes im ersten Intron des ß3-Tubulingens nahe (Gasch et al., 1989).

4.2.2.4. Vergleich der Expression des ß3-Tubulingens mit der von ß3/*lacZ*-Fusionsgenen in dorsalisierten Mutanten

Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben wurde, wird dem sich entwickelnden Embryo durch verschiedene maternal und zygotisch exprimierte Gene eine dorso/ventral-Polarität vermittelt (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1986; Anderson 1987; Ingham 1988). Drei der Gene, deren Mutation einen dorsalisierenden Effekt hat, das maternal exprimierte *dorsal*-Gen und die beiden zygotisch exprimierten Gene *twist* und *snail*, kodieren wahrscheinlich für Transkriptionsfaktoren (Steward, 1987; Thisse et al., 1988; Boulay et al., 1987). Das *dorsal*-Genprodukt scheint die Expression von *twist*, und möglicherweise auch *snail*, im ventralen Bereich früher Embryonen zu initiieren (Levine, 1988). Die Funktion dieser drei Gene ist jedenfalls für die Entstehung des Mesoderms von entscheidender Bedeutung. Nach Mutation zeigen die betroffenen

Embryonen einen vergleichbaren Phänotyp: Allen gemeinsam ist das Nichtvorhandensein einer Ventralfurche während der Gastrulation und das damit einhergehende völlige Fehlen des Mesoderms (Campos-Ortega, 1983; Simpson 1983). Die Entwicklung ventro-lateral liegender Zellen, die dem neurogenen Ektoderm zuzuordnen sind, ist in unterschiedlichem Maße ebenfalls verändert. Der Phänotyp starker Allele von *dorsal* ist insofern etwas extremer, als hier die Entwicklung weiter lateral liegender Zellen in stärkerem Maße betroffen ist: Solche Embryonen entwickeln sich zu einem hohlen epidermalen Schlauch ohne innere Organe, mit der Ausnahme einiger Nervenzellen im Kopfbereich und Resten des Darmes (Campos-Ortega, 1983).
Um zu überprüfen, ob die Expression des ß3-Tubulingens spezifisch für das Mesoderm ist, wurden dorsalisierte Embryonen (*dorsal*, *twist*, *snail*) mit dem Antiserum gegen ß3-Tubulin gefärbt (Leiss et al., 1988). Da diesen Embryonen ein völliges Fehlen des Mesoderms gemeinsam ist, sollte nur dann eine Färbung feststellbar sein, wenn das ß3-Tubulingen auch in ektodermalen oder endodermalen Zellen exprimiert wird.
Wie man in Abbildung 18 erkennt, wird die Expression von ß3-Tubulin durch starke Allele von *dorsal*, *twist* und *snail* (siehe Legende zu Abb. 18) deutlich vermindert, sie ist jedoch nicht völlig abwesend. In allen drei Fällen erkennt man ein Paar langer Axone im Kopfbereich, wie dies in Abbildung 18G für *snail* beispielhaft gezeigt ist. Diese Axone werden ebenfalls in Wildtyp-Embryonen mit dem ß3-spezifischen Antiserum angefärbt. Ihre Identifizierung ist jedoch durch die darüberliegenden, stark gefärbten Muskeln, sehr erschwert. Somit ergab dieses Ergebnis einen ersten Hinweis darauf, daß die Expression des ß3-Tubulingens nicht auschließlich auf die mesodermalen Derivate beschränkt ist.
Wie man in Abbildung 18 ebenfalls erkennt, waren in allen drei Fällen zusätzlich gefärbte Strukturen in anterioren und posterioren Regionen der Embryonen erkennbar. Eine Zuordnung zu bestimmten Strukturen oder Geweben konnte für sie nicht getroffen werden.
Ein deutlicher Unterschied zwischen *dorsal* und den beiden Mutanten der zygotisch exprimierten Gene, *twist* und *snail*, fällt hingegen schon unter geringer Vergrößerung sofort ins Auge. In den beiden letzteren erkennt man gefärbte Strukturen mit segmentartiger Anordnung (Abbildung 18D,F). Unter stärkerer Vergrößerung erkennt man sowohl in *twist*-, wie auch in *snail*-Embryonen, in ihnen langgestreckte Zellen in paralleler Anordnung (Abbildung 18E,H). Obgleich diese Zellen eine große Ähnlichkeit mit Muskelzellen aufweisen, muß dies, vor allem wegen der Abwesenheit des Mesoderms in solchen Embryonen, als sehr unwahrscheinlich gelten.

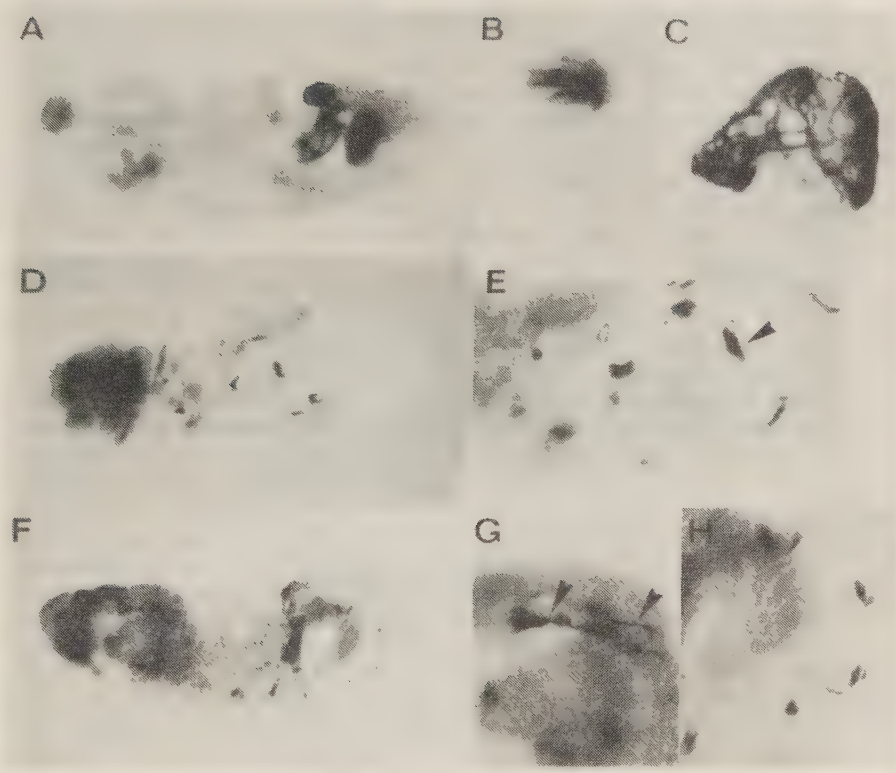


Abb. 18: Expression von ß3-Tubulin in dorsalisierten Embryonen

Die gezeigten Embryonen wurden mit dem Antiserum gegen ß3-Tubulin (Leiss et al., 1988) gefärbt und sind mit dem anterioren Ende nach links ausgerichtet.

A - C: Embryonen, deren Mütter homozygot für das starke *dorsal*-Allel dl^1 waren (Nüsslein-Volhard, 1979). A zeigt einen Embryo in Übersicht, B und C Ausschnitte der gefärbten, an den Enden lokalisierten Strukturen eines anderen Embryos.

D - E: Embryo, homozygot für sna^{11G05} (Simpson, 1983; Nüsslein-Volhard et al., 1984). In der Übersicht (D) bzw. im Ausschnitt (E) sind gefärbte Strukturen in segmentaler Anordnung zu sehen (siehe Pfeil in E). Möglicherweise handelt es sich hierbei um die chordotonalen Organe (siehe Text).

F - G: Embryo, homozygot für Df(2R)twi^{S60}, einer kleinen Deletion im Bereich des *twist*-Gens (Simpson, 1983; Thisse et al., 1987a); F zeigt eine Übersicht, G und H Ausschnitte des gleichen Embryos. Die Pfeile in G zeigen auf die langen Axone im Kopfbereich. In H sieht man die segmental angeordneten Strukturen (vgl. E).

Vielmehr handelt es sich bei diesen Zellen wahrscheinlich um die sogenannten chordotonalen Organe, lateral liegende Sinnesorgane, denen eine Funktion in der Dehnungsrezeption zugeschrieben wird (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Dafür spricht das Vorhandensein gefärbter, ähnlich angeordneter Strukturen in Wildtyp-Embryonen, die wiederum wegen der starken Färbung der Muskulatur nur äußerst schwer identifizierbar sind. Verschiedene, mit den chordotonalen Organen reagierende Antikörper liefern ein äußerst ähnliches Bild (vergleiche Bodmer et al., 1987), was eine ß3-Expression in diesen, dem peripheren Nervensystem zuzuordnenden, Strukturen sehr wahrscheinlich macht. Hierfür spricht auch die von Hartenstein (1988) beobachtete, große Anzahl von Mikrotubuli in den chordotonalen Organen.
Wenngleich die Expression von ß3-Tubulin in dorsalisierten Mutanten noch einiger Klärung bedarf, so kann doch folgendes als gesichert gelten. ß3-Tubulin wird im Laufe der Embryogenese nicht ausschließlich in mesodermalen Derivaten exprimiert. Vielmehr findet sich ß3-Tubulin auch in einem Paar, langer Axone im Kopf und wahrscheinlich auch in den chordotonalen Organen. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen diese Organe einerseits, und ß3-Tubulin andererseits, könnten diese Vermutung erhärten. Andererseits ist auch das Vorhandensein von Muskelzellen in *twist*- und *snail*-Embryonen nicht völlig auszuschließen. Antikörper gegen andere Muskelantigene, beispielsweise Myosin oder Aktin, sollten hier bei einer Klärung helfen. Abschließend sollte jedoch festgehalten werden, daß weder das *twist*- noch das *snail*-Protein notwendig sind, um die ß3-Expression in diesen Zellen zu gewährleisten.
Um entscheiden zu können, ob 5´-benachbarte Bereiche oder das erste Intron des ß3-Tubulingens an der Expression in den oben beschriebenen Axonen bzw. segmental angeordneten Zellen beteiligt ist, mußten zunächst verschiedene Kreuzungen angesetzt werden. Zwei für pW/ß3/lac-6,0I und pW/ß3/lac-6,0 transgene Linien, die sich durch An- bzw. Abwesenheit des Introns unterscheiden, wurden für eine kleine Deletion im Bereich des *twist*-Gens (siehe Text zu Abb. 19), homozygotisiert und dann die embryonale ß-Galaktosidase-Expression untersucht.
In beiden Fällen konnte in den zwei Axonen im Kopfbereich keine Expression beobachtet werden (Abb. 19B,C). Möglicherweise findet in diesen Zellen Expression, aber kein axonaler Transport von ß-Galaktosidase statt. Wie man aus dem Vergleich der Abbildungen 19B und C erkennt (Abb. 19A zeigt die Expression von ß3-Tubulin), ist die Anwesenheit des Introns nötig, um ß-Galaktosidase-Expression in den segmental angeordneten Zellen erkennen zu können. Die Expression in diesen Zellen ist daher ebenfalls von

Kontrollelementen im Intron abhängig, wie dies auch für die Expression in der viszeralen Muskulatur gezeigt wurde (vgl. Abschnitt 4.2.2.3.2.).

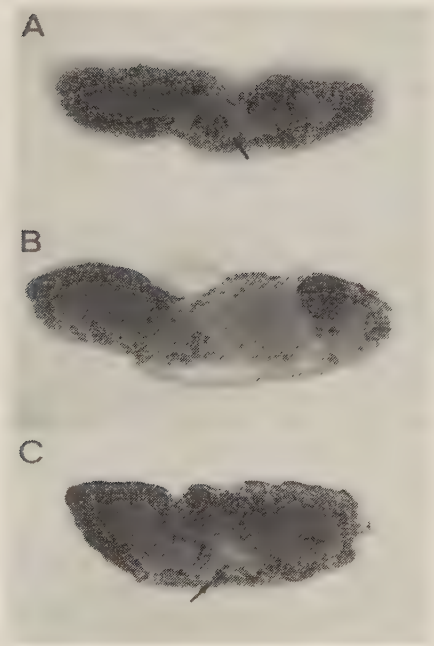


Abb. 19: Expression von pW/ß3/lac-6,0 und pW/ß3/lac-6,0I in *twist*-Embryonen

Die gezeigten Embryonen sind homozygot für Df(2R)*twi*^{S60} (siehe Simpson, 1983 und Thisse et al., 1987a) und mit dem anterioren Ende nach links ausgerichtet. Die Embryonen in B und C sind zusätzlich transgen für die Konstrukte pW/ß3/lac-6,0 bzw. pW/ß3/lac-6,0I. Pfeile in A und C deuten auf die segmental angeordneten Strukturen.
A: Färbung mit dem Antiserum gegen ß3-Tubulin (Leiss et al., 1988).
B: Expression von pW/ß3/lac-6,0. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen ß-Galaktosidase (Promega). Im Gegensatz zu A und C fehlt die Expression in den Strukturen mit segmentaler Anordnung.
C: Expression von pW/ß3/lac-6,0I. Färbung wie in B.

5. DISKUSSION

5.1. Struktur des ß3-Tubulingens

Vor einer funktionellen Analyse des ß3-Promotors mußte die Transkriptionseinheit genauer charakterisiert werden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse für den trankribierten Bereich wie auch den Promotor sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.1.1. Das ß3-Tubulingen besitzt ein großes Intron an konservierter Position

Wie in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, besitzt das ß3-Tubulingen ein Intron zwischen den Kodons für Aminosäure 19 und 20. Ein Intron an dieser Stelle ist auch in den ß-Tubulingenen aller bisher untersuchter Vertebraten vorhanden (Cleveland und Sullivan, 1985; Lewis et al, 1985). Konserviert ist zu diesen ebenfalls die Position des zweiten Introns im Kodon für Aminosäure 56, wie die Analyse von Rudolph et al. (1987) ergab, nicht aber die des dritten Introns des ß3-Tubulingens, die sich zwischen Kodon 137 und 138 befindet. Berücksichtigt man, daß das ß3-Tubulingen im dritten Exon für sechs zusätzliche Aminosäuren kodiert, so befindet sich das einzige Intron im testis-spezifisch exprimierten ß2-Tubulingen bei Position 131/132 an analoger Stelle (Michiels et al., 1987). Das einzige Intron des ß1-Tubulingens befindet sich wie das erste des ß3-Tubulingens zwischen den Kodons für Aminosäure 19 und 20 (Bialojan, 1985; Michiels et al., 1987). Die bei Vertebraten-ß-Tubulingenen zu beobachtende strikte Konservierung der Anzahl und Position von Introns ist innerhalb einer *Drosophila*-Spezies nicht mehr zu beobachten. Möglicherweise besitzen einige der Introns keine Funktion mehr und werden daher bei Organismen mit kurzer Generationszeit und kleinem Genom, wie *Drosophila*, im Laufe der Evolution wieder beseitigt oder aber verkleinert.
Daraus ergibt sich ein anderer interessanter Aspekt, ein Größenvergleich der oben erwähnten Introns innerhalb der verschiedenen *Drosophila*-ß-Tubulingene. Die beiden Introns zwischen Kodon 19 und 20 im ß1- und ß3-Tubulingen sind verglichen mit denen der anderen auffällig groß (2600 und 4500 Basen) gegenüber 62 (ß3-Intron 2), 56 (ß3-Intron 3) und 59 (ß2) Basen (Michiels et al., 1987; Rudolph et al., 1987). Wie kürzlich von Bingham et al. (1988) spekuliert wurde, sollte die Größe eines Introns bei *Drosophila* einen Hinweis auf mögliche Funktionen (z. B. differentiell reguliertes "Splicing" oder die Anwesenheit eines zusätzlichen Promotors; zur Diskussion siehe Abschnitt 5.2.3.) geben: Die Autoren hatten sieben verschiedene Gene, bei denen mögliche Funktionen von Introns genau untersucht waren, zu einem

Größenvergleich herangezogen. Von insgesamt 18 Introns zeigten 12 keine regulative Funktion. Ihre Größe schwankte zwischen 54 und 75 Nukleotiden. Hingegen waren alle Introns, denen eine regulative Funktion zugeschrieben werden konnte, deutlich größer (zwischen 191 und 2700 Nukleotiden). Das Vorhandensein je eines großen Introns im ß1- und ß3-Tubulingen deutete also auf eine mögliche Beteiligung dieser Introns bei der Expression der beiden Gene. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bewahrheitete sich diese Hypothese für das ß3-Tubulingen mit dem Auffinden eines gewebespezifischen Enhancers. Auch im Falle des ß1-Tubulingens gibt es starke Hinweise auf transkriptionell regulierende Elemente im großen Intron (D. Buttgereit und R. Renkawitz-Pohl, persönliche Mitteilung).

5.1.2. Der Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens ist in Embryonen und Puppen identisch

Eine Möglichkeit, mit der eine Feinregulation der Genexpression in den verschiedensten Entwicklungsstadien und Gewebetypen erleichtert werden kann, besteht im Entstehen von Genfamilien. So erlaubt die Redundanz struktureller Information im Genom, eine Divergenz der sie regulierenden Elemente. Strukturell gleichartige Information kann somit der verschiedenartigsten Regulation unterliegen. Eine andere Möglichkeit, mit der eine komplexe Regulation desselben Gens leichter bewältigt werden kann, besteht in der Schaffung verschiedener, räumlich getrennter Promotoren. Ein Beispiel für eine unterschiedliche Lösung in nahe verwandten Arten ist das *Adh*-Gen von *Drosophila*. *Drosophila melanogaster* besitzt ein *Adh*-Gen mit zwei unterschiedlichen Promotoren (Benyajati et al., 1983; Savakis et al., 1986). In Larven erfolgt die Transkription von einem proximal gelegenen, in adulten Fliegen hingegen von einem weiter distal gelegenen Promotor und "Splicing" auf einen Punkt im larvalen "Leader". Da in beiden Fällen ein identisches Genprodukt erzeugt wird, besteht der Vorteil hier wahrscheinlich in der Vereinfachung der komplexen Regulation. Hingegen besitzen *Drosophila mojavensis* und *Drosophila mulleri* zwei funktionelle *Adh*-Gene (Batterham et al., 1983a). Die Regulation dieser Gene ähnelt denen des larvalen bzw. adulten Promotors von *Drosophila melanogaster*, auch wenn gleichzeitig ein weiterer Vorteil der Genduplikation, nämlich das Kodierungspotential für zwei funktionell unterschiedliche Enzymvarianten zu schaffen, verwirklicht wurde (Batterham et al., 1983b).
Das ß3-Tubulingen wird während der Entwicklung in zwei unterschiedlichen Phasen exprimiert. So finden sich in etwa gleiche Häufigkeiten von ß3-mRNA in der mittleren Embryogenese und der mittleren Metamorphose (Bialojan et al., 1984; Gasch et al., 1988).

Das Gen muß also im Verlaufe der Entwicklung zweimal an- und wieder abgeschaltet werden, was durch das Vorhandensein unterschiedlicher Transkriptionsstarts in beiden Entwicklungsstadien vereinfacht sein könnte. Da die ß3-mRNA in Embryonen und Puppen das gleiche 5´-Ende besitzt, konnte jedoch die Existenz voneinander getrennter Promotoren ausgeschloßen werden. In Zusammenhang mit der komplexen Expression des ß3-Tubulingens ließ dies unterschiedliche *cis*-regulierende Elemente vermuten, die auf denselben Promotor einwirken.

5.1.3. Der Promotor des ß3-Tubulingens besitzt eine ungewöhnliche Struktur

Am 5´-Ende vieler *Drosophila*-mRNAs findet sich die Sequenz ATCAGTT/C (Snyder et al., 1982; Hultmark et al., 1986). Dieses Sequenzmotiv ist am Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens absolut konserviert. Wenngleich die Bedeutung dieses Elementes unklar ist, so fällt doch auf, daß es bei solchen Genen besonders konserviert ist, die keine typische TATA-Box besitzen. Mutation dieses Elementes im *hsp22*-Gen resultiert in einer deutlichen Abnahme der mRNA-Konzentration, wie Hultmark et al. (1986) nach Keimbahn-Transformation zeigen konnten. Außerdem konnte bei diesen Experimenten eine Verschiebung des Transkriptionsstarts beobachtet werden. Das konservierte Element könnte daher sowohl die Trankriptionsrate wie auch die Position des Transkriptionsstarts bestimmen helfen. Andererseits könnte es eine Bedeutung auf posttranskriptioneller Ebene besitzen und somit an der Stabilität, dem Transport oder auch der Translation der mRNA beteiligt sein.
Betrachtet man sich die Sequenz vor dem Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens, so kann man in der Region um -30 keine Homologie zur TATA- oder Goldberg-Hogness-Box erkennen. Dieses bei fast allen eukaryontischen Genen vorkommende Promotorelement scheint vor allem für die Positionierung des Transkriptionsstarts wichtig zu sein (zur Übersicht siehe Nevins, 1983; Bucher und Trifonov, 1986). Daß die oben erwähnte Sequenz am Transkriptionsstart des ß3-Tubulingens hier eine analoge bzw. ergänzende Funktion ausübt, scheint möglich.
Starke Indizien für eine Beteiligung dieses Sequenzmotivs an der Transkriptionsinitiation kommen von *in vitro*-Transkriptionen verschiedener Deletionen des *engrailed*-Gens (Soeller et al., 1988). Transkription dieses Gens, das ebenfalls keine TATA-Box besitzt, initiiert an vier verschiedenen Nukleotiden (zwischen +1 und +6). Zwischen +8 und +14 findet sich das konservierte Sequenzmotiv. Interessanterweise zeigten verschiedene Promotordeletionen mit distalen Endpunkten zwischen -46 und +4 (!) eine vergleichbare Transkriptionseffizienz. Deletion bis +15 führte hingegen zu einer

drastischen, wenn nicht völligen, Abnahme der Transkription, was darauf hindeutet, daß das hierbei deletierte, konservierte Sequenzelement eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation spielt.
Neben der TATA-Box besitzen typische eukaryontische Promotoren zwischen der TATA-Box und ca. -100 weitere Sequenzelemente, die sogenannten "upstream promoter elements" oder kurz UPEs (zur Übersicht siehe Maniatis et al., 1987). Als einen typischen Vertreter dieser UPEs besitzen viele Gene zwischen -70 und -80 eine CAAT-Box (Efstradiatis et al., 1980; Benoist und Chambon, 1981). Die Zahl und Art verschiedener UPEs scheint die Stärke eines Promotors festzulegen (Maniatis et al., 1987).
Im Promotor des ß3-Tubulingens findet sich jedoch in diesem Bereich keine Homologie zu einem der bekannten UPEs.
Ein Vergleich der ß3-Promotorsequenzen mit denen des ß1-Tubulingens ergab keine erkennbaren Gemeinsamkeiten, eine auffällige Homologie jedoch mit der des ß2-Tubulingens: Die Sequenz zwischen -58 und -47 im Promotor des ß3-Tubulingens (siehe Abb. 6) findet sich mit einer nur geringfügigen Abweichung zwischen -50 und -39 auch im Promotor des ß2-Tubulingens von *Drosophila melanogaster* und bemerkenswerter Weise auch von *Drosophila hydei* (Gasch et al., 1988). Wie sich in der Zwischenzeit herausstellte, ist dieses Sequenzmotiv für die Testis-spezifische Expression des ß2-Tubulingens notwendig (Michiels, F., Gasch, A., Kaltschmidt, B. und Renkawitz-Pohl, R., zur Publikation eingereicht). Ob das Vorhandensein dieses Elementes im ß3-Promotor eine funktionelle Bedeutung hat, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden.
Da eine koordinierte Expression von α- und ß-Tubulinen in einem Organismus stets sichergestellt sein muß, eine analoge Regulation von α- und ß-Tubulingenen also durchaus vorstellbar ist, könnte sich dies in einer Übereinstimmung funktionell analoger Promotoranteile wiederspiegeln. Ein deswegen durchgeführter Sequenzvergleich mit den Promotorsequenzen der α-Tubulingene (vgl. Theurkauf et al., 1986) ergab jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen. Dies könnte allerdings damit zusammenhängen, daß die Transkriptionsstarts der α-Tubulingene nach bestmöglicher Übereinstimmung mit bekannten Sequenzelementen (z.B. TATA-Box) festgelegt, und nicht in allen Fällen mit entsprechenden Methoden (S1-Analyse oder "Primer Extension"-Analyse) abgesichert wurden und zudem der bekannte Anteil an 5´-benachbarten Sequenzen sehr gering ist.

5.2. Regulation des ß3-Tubulingens

Die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Ergebnisse erbrachten Hinweise darauf, daß zumindest drei voneinander unabhängige Elemente an der Regulation des ß3-Tubulingens beteiligt sind. In der Nähe des Transkriptionsstarts gelegene Sequenzen erwiesen sich als ausreichend für die korrekte Initiation der Transkription, nicht aber für die korrekte gewebespezifische Expression des Gens. Sequenzen distal von -1,2 kb relativ zum Transkriptionsstart erwiesen sich als notwendig für eine, positionsunabhängige, Expression in der somatischen und der Herz-Muskulatur und Sequenzen im ersten Intron für die Expression in der viszeralen Muskulatur. Die sich daraus ergebenden Schlußfolgerungen sollen im folgenden diskutiert werden.

5.2.1. Nahe am Transkriptionsstart gelegene Sequenzen verleihen dem ß3-Promotor konstitutive Eigenschaften

Durch die Analyse transienter Expression nach Mikroinjektion von Embryonen konnte gezeigt werden, daß verschiedene Promotordeletionen, überraschenderweise auch eine, die nur 28 bp vor dem Transkriptionsstart enthält, ausreichend für die korrekte Initiation der Transkription sind. Dies konnte in mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert werden (U. Hinz und R. Renkawitz-Pohl, persönliche Mitteilung).
Eine den Transkriptionsstart positionierende Sequenz sollte daher zwischen -28 und +116 (an dieser Stelle erfolgte die Fusion zum *lacZ*-Gen) gefordert werden. Wenngleich die Existenz einer aberranten TATA-Box proximal von -28 nicht ausgeschloßen werden kann, so scheint doch eine Beteiligung der konservierten Sequenz zwischen +1 und +7 an der Transkriptionsinitiation möglich, wie weiter oben bereits diskutiert wurde.
Bienz et al. (1988) konnten zeigen, daß Sequenzen in 3´-Richtung von -6 im *Ubx*-Gen für eine charakteristische, wenn auch schwache, Expression von *Ubx/lacZ*-Fusionsgenen nach Keimbahntransformation verantwortlich sind. Betont werden sollte dabei, daß auch der Ubx-Promotor, wenn überhaupt, eine sehr aberrante TATA-Box enthält.
Nahe am Transkriptionsstart gelegene Sequenzen, ohne Beteiligung einer typischen TATA-Box, sind also für die Transkription des ß3-Tubulingens ausreichend. Wie sich jedoch nach Keimbahntransformation verschiedener ß3/*lacZ*-Fusionsgene zeigte, erlauben diese Sequenzen Expression in den verschiedensten, wenn nicht allen Geweben des Embryos. In Abhängigkeit vom Integrationsort wurden in den jeweiligen Linien somit verschiedenste

Expressionsmuster beobachtet, die keine deutlichen Gemeinsamkeiten mit der charakteristischen ß3-Expression aufwiesen. Dieses Verhalten änderte sich nicht, wenn ausgehend von einer Promotordeletion bis -28 (mit dieser Deletion konnte allerdings nur schwache Expression beobachtet werden), sukzessive bis zu 1,2 kb der Sequenzen vor dem Transkriptionsstart hinzugefügt wurden. Die Beobachtung, daß die Expression von P-Element-transformierten-Genen, in Abhängigkeit vom jeweiligen Integrationsort, starken quantitativen Schwankungen unterliegen kann, ist ein seit längerem bekanntes Phänomen (Spradling und Rubin, 1983; Goldberg et al., 1983; Scholnick et al., 1983; Hiromi et al., 1985). Daß diese Effekte jedoch auch die Gewebespezifität der Expression grundsätzlich verändern können, wurde vor kurzem erstmalig gezeigt (O`Kane und Gehring, 1987). Nach Fusion des schwach konstitutiven P-Element-Promotors an das *lacZ*-Gen konnten in Abhängigkeit vom jeweiligen Integrationsort die unterschiedlichsten Expressionsmuster beobachtet werden. Dabei wurde die Möglichkeit hervorgehoben, durch solche Effekte regulierende Elemente (z. B. "Enhancer") im Genom lokalisieren und klonieren zu können. In der Zwischenzeit gelang im Labor von Walther Gehring die Isolation von Genen, die der Integrationsstelle benachbart sind und ein zu dem Fusionsgen sehr ähnliches Expressionsmuster zeigen (Hugo Bellen, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit geschilderten analogen Ergebnisse für die kürzeren ß3/*lacZ*-Fusionsgene legen im wesentlichen zwei Schlußfolgerungen nahe.

Zum einen vermitteln nahe am ß3-Transkriptionsstart gelegene Sequenzen mehr oder minder konstitutive Expression. Die Transkription scheint dabei von ubiquitären Faktoren vermittelt zu werden. Eine Beteiligung räumlich lokalisierter Transkriptionsfaktoren auf dieser Ebene der Regulation ist also extrem unwahrscheinlich.

Zum anderen scheint die "relative Exposition" eines Promotors zu einem im Genom benachbarten "Enhancer"-Element nicht nötig zu sein, um die erwähnten Positionseffekte beobachten zu können, wie dies von O´Kane und Gehring vermutet wurde: Bei den in dieser Arbeit untersuchten Anordnungen war stets sowohl in 5´ Richung (P-) wie auch in 3´-Richtung (*hsp70*-) ein weiterer Promotor zwischen dem Fusionsgen und dem in der genomischen Nachbarschaft zu vermutenden "Enhancer"-Element lokalisiert. Ihren Einfluß scheinen diese Elemente also nicht nur auf jeweils direkt benachbarte Promotoren ausüben zu können.

5.2.2. Distal von -1,2 kb gelegene Sequenzen regulieren die positionsunabhängige Expression des ß3-Tubulingens in der somatischen und der Herzmuskulatur

Die oben diskutierten, starken Positionseffekte waren nicht mehr zu beobachten, wenn die ß3-Promotordeletion bis -6,0 kb reichte. Statt dessen konnte starke Expression in der somatischen und der Herzmuskulatur beobachtet werden. Im Unterschied zum endogenen ß3-Tubulin fand sich jedoch in keinem Fall Expression in der viszeralen Muskulatur.
Zwischen -1,2 kb und -6,0 kb muß also zumindest ein Element lokalisiert sein, das die Expression in der somatischen und der Herzmuskulatur sicherstellt (Gasch et al., 1989). Ob hierbei ein, oder auch mehrere "Enhancer"-Elemente beteiligt sind, kann bisher nicht beantwortet werden. Das völlige Fehlen der Expression in der viszeralen Muskulatur legt einige Schlußfolgerungen nahe, die weiter unten diskutiert werden sollen.
Ein weiterer Unterschied zu kürzeren Promotordeletionen bestand in der Abwesenheit auffälliger Positionseffekte. Dies könnte durch einen unspezifischen Puffereffekt der Sequenzen zwischen -6,0 kb und -1,2 kb erklärt werden. Man könnte in dieser Region jedoch auch eine Anheftungsstelle zur Kernmatrix vermuten. Diese SARs konnten 5´-und 3´-benachbart zu einigen stark transkribierten *Drosophila*-Genen (*Adh*, *Sgs4*, *ftz*), und zwar in direkter Nachbarschaft zu den diese Gene regulierenden "Enhancer"-Elementen, kartiert werden (Gasser und Laemmli, 1986; 1987). Dabei korrelierte das Vorhandensein der SARs mit einer starken Verringerung der nach P-Element-Transformation zu beobachtenden Positionseffekte. Eine mögliche Funktion der SARs könnte also in einer Abgrenzung von in der Nachbarschaft liegenden regulatorischen Elementen liegen. Als eine weitere mögliche Funktion wurde ihre Beteiligung an einer Sub-Kompartimentierung im Kern diskutiert: Durch SARs gebildete "Loops" gleichartig regulierter Gene könnten sich in direkter Nachbarschaft befinden, wodurch die Regulation dieser Gene erheblich vereinfacht würde (Mirkovitch et al., 1984; Gasser und Laemmli, 1986).

5.2.3. Ein "Enhancer"-Element im ersten Intron des ß3-Tubulingens ist für die korrekte Expression in der viszeralen Muskulatur notwendig

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Sequenzen im ersten Intron des ß3-Tubulingens für die Expression in der viszeralen Muskulatur notwendig sind (Gasch et al., 1989).

Weiterhin zeigte sich, daß dieser Effekt auch dann zu beobachten war, wenn sich diese Sequenzen hinter dem Indikatorgen befanden. Die Vermutung, daß sich ein gewebespezifisches "Enhancer"-Element in diesem Bereich befindet, liegt daher nahe. Zwei der Definitionen eines "Enhancers" (vgl. hierzu Serfling et al., 1985; Maniatis et al., 1987) sind zumindest erfüllt: Die Stimulation der Transkription auch in großer Entfernung vom Transkriptionsstart (sie wurde um ca. 4,6 kb vergrößert) und die Funktionsfähigkeit auch hinter der Transkriptionseinheit. Inzwischen wurde auch eine weitere der "Enhancer"-Definitionen erfüllt, nämlich die Stimulation der Transkription eines heterologen Promotors: Expression von ß-Galaktosidase in der viszeralen Muskulatur wird durch das Intron auch stimuliert, wenn der ß3- gegen den *hsp70*-Promotor ausgetauscht wird (U. Hinz und R. Renkawitz-Pohl, persönliche Mitteilung). Diese Stimulation wird unabhängig davon beobachtet, ob sich das Intron vor oder hinter der Transkriptionseinheit befindet.
Vereinzelt wurden "Enhancer"-Elemente in Introns verschiedener Vertebraten-Gene gefunden. Als gut untersuchte Beispiele sollten hier die B-Zell-spezifischen "Enhancer" in den Introns der Immunglobulin-Gene (Gillies et al., 1983; Banerij et al., 1983), sowie der Linsen-spezifische Enhancer im δ1-Crystallingen des Huhns (Hayashi et al., 1987) angeführt werden. Auch für *Drosophila* gab es Hinweise in dieser Richtung: Die Anwesenheit des Introns im *yellow*-Gen erwies sich als notwendig für die volle Rettung des mutanten Phänotyps (Geyer und Corces, 1987). Eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene, wie sie für das ß3-Tubulingen eindeutig ausgeschlossen wurde, ist in diesem Fall jedoch ebenso möglich.
Wie weiter oben schon erwähnt, wurde vemutet, daß die Größe eines Introns bei *Drosophila* einen Indikator für eine Beteiligung an der Genregulation darstellt (Bingham et al., 1988). Dies kann auf der Ebene eines differentiell regulierten "Splicing" (Laski et al., 1986; Chou et al., 1987; Zachar et al., 1987; Boggs et al., 1987) oder durch Anwesenheit eines zusätzlichen Promotors (Benyajati et al, 1983) erfolgen. Wie erstmalig in dieser Arbeit für das ß3-Tubulingen gezeigt, zählen auch "Enhancer"-Elemente in Introns dazu.

5.2.4. Die Regulation des ß3-Tubulingens als Modellsystem für die hierarchische Genaktivierung im Mesoderm

Die in dieser Arbeit geschilderten Versuche sollten die Grundlagen liefern, um verschiedene Fragen der genetischen Kontrolle während der frühen Differenzierung im Mesoderm untersuchen zu können.
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen das *twist*- und das *snail-Protein*, bei denen es sich wahrscheinlich um

Transkriptionsfaktoren handelt, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Mesoderms (Levine, 1988). Da sich die Expression von *twist* (über eine räumliche Expression von *snail* liegen bisher keine Daten vor) auf die im Laufe der Gastrulation invaginierenden Zellen beschränkt (Thisse et al., 1987b; 1988), wäre eine direkte oder indirekte Beteiligung von *twist* an der ß3-Expression denkbar.
Als ein erstes wichtiges Ergebniss in dieser Richtung zeigte sich, daß die Expression des ß3-Tubulingens in verschiedenen Derivaten des Mesoderms durch mindestens zwei voneinander unabhängige *cis*-ständige Elemente reguliert wird. Aufgrund dieses Ergebnisses scheint eine direkte, vor allem aber alleinige Kontrolle der ß3-Expression durch den möglichen Transkriptionsfaktor *twist* eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch die Anwesenheit einzelner ß3-exprimierender Zellen (Axone und chordotonale Organe) in Embryonen mit einer Deletion des *twist*-Gens. Als ein sehr viel wahrscheinlicherer Kandidat für eine direkte Regulation durch *twist* kann das *PS2*-Gen gelten, das Homologie zu den ß-Untereinheiten der Vertebraten-Integrine besitzt und dem unter anderem eine entscheidende Aufgabe bei der Anheftung der Muskeln zukommt (Bogaert et al., 1987): Die Transkription dieses Gens weist eine enge zeitliche und räumliche Korrelation mit der Expression des *twist*-Gens auf. So beginnt die Transkription des *PS2*-Gens in den Zellen des präsumptiven Mesoderms bereits vor der Gastrulation, also wesentlich früher als die des ß3-Tubulingens (Bogaert et al., 1987). Für eine direkte Regulation des *PS2*-Gens durch *twist* spricht auch die völlige Abwesenheit der *PS2*-Expression in Embryonen mit einer Mutation des *twist*-Gens (Ingham, 1988).
Die unabhängige Regulation des ß3-Tubulingens in voneinander räumlich getrennten Gewebetypen im Mesoderm scheint demgegenüber eine komplexere Situation wiederzuspiegeln.
Zum Zeitpunkt der frühen Gastrulation sind die Zellen der Ventralfurche zwar für eine mesodermale Entwicklungsrichtung determiniert, nicht jedoch für ein bestimmtes Derivat, wie z.B. das viszerale oder das somatische Mesoderm (Technau, 1987). Zwischen diesem Zeitpunkt und dem Beginn der ß3-Transkription in viszeralem und somatischem Mesoderm (spätes Stadium 11) müssen die invaginierten Zellen bei ihrer Entwicklung in diese beiden Derivate durch unterschiedliche genetische Programme gelenkt werden. Dabei ist die Existenz von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren in beiden Programmen vorstellbar. Jedenfalls sollte dies auf zwei unterschiedlichen Wegen auch zum Anschalten des ß3-Tubulingens führen, wahrscheinlich durch verschiedene Transkriptionsfaktoren in viszeralem und somatischem Mesoderm.
Als ein *trans*-agierender Faktor, der möglicherweise an der Expression des ß3-Tubulingens in der viszeralen Muskulatur

beteiligt ist, kann das *H2.0*-Genprodukt gelten. Dieses Gen, das durch Kreuzhybridisierung mit der *Scr*-Homeobox isoliert wurde, wird spezifisch in Zellen des viszeralen Mesoderms transkribiert (Barad et al., 1988). Transkripte in diesem Derivat finden sich von Stadium 11 - also vor oder gleichzeitig mit Beginn der ß3-Transkription - bis in die späte Embryogenese. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß eine große Deletion, die zum Verlust des *H2.0*-Gens führt, eine Veränderung der typischen Form des Darmes in betroffenen Embryonen zur Folge hat: Gegen Ende der Embryogenese besitzt dieser statt der charakteristischen Konstriktionen eine ballonförmige Gestalt (Barad et al., 1988). Analyse der ß3-Expression in *H2.0*-Mutanten könnte einen wertvollen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von *H2.0* an der ß3-Expression liefern. Ebenfalls sinnvoll erscheinen Bindungsstudien des *H2.0*-Proteins im ersten Intron des ß3-Tubulingens, wobei jedoch zunächst eine weitere Eingrenzung der für die Regulation wichtigen Bereiche erfolgen sollte.
Für die ß3-Expression in der somatischen bzw. Herzmuskulatur ist bisher kein dem *H2.0*-Gen analoger Kandidat bekannt. Eine weitere Eingrenzung der an der Regulation beteiligten Sequenzen distal von -1.2 kb ist notwendig, um Bindung *trans*-agierender Faktoren in diesem Bereich untersuchen zu können.
Bei der Suche nach *trans*-agierenden Faktoren scheint auch eine systematischere Vorgehensweise sinnvoll. So könnte die Analyse großer, das Genom möglichst umfassend abdeckender, Defizienzen bei der groben Lokalisierung der für solche Faktoren kodierenden Gene helfen. Dabei würde der Verlust eines dieser Gene den Verlust der ß3-Expression in einer oder mehrerer der ß3-charakteristischen Expressionsdomänen zur Folge haben. Durch eine Mutagenese über die fraglichen Defizienzen oder eine komplementierende Analyse lethaler P-Element-Insertionen mit entsprechendem Expressionsmuster könnten die jeweiligen Gene eingegrenzt oder mittels Transposon-"tagging" direkt kloniert werden.
Denkbar wäre auch eine systematische Suche mit Hilfe des von O`Kane und Gehring (1987) entwickelten "Enhancer trapping". Dabei wären Insertionen besonders interessant, bei denen das beobachtete Expressionsmuster des Indikatorgens Gemeinsamkeiten mit denen von ß3-Tubulin aufweist.
Die geschilderten Wege sollten es erlauben die *trans*-agierenden Faktoren aufzufinden, die an der Regulation des ß3-Tubulingens beteiligt sind. Das Studium ihrer Expression sollte dabei helfen, die für die Mesodermdifferenzierung verantwortlichen genetischen Programme zu entschlüsseln. Durch Auffinden getrennter *cis*-agierender Elemente, die die Expression des ß3-Tubulingens in verschiedenen Derivaten des Mesoderms regulieren, wurden die Grundlagen hierzu im Rahmen dieser Arbeit gelegt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Akam, M.E. (1987)
The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo
Development **101**, 1-22

Anderson, K.V. (1987)
Dorsal-ventral embryonic pattern genes of *Drosophila*
Trends Genet. **3**, 91-97

Anderson, K.V., Nüsslein-Volhard, C. (1986)
Dorsal-group genes of *Drosophila*
in: Gall, J. (Hrsg.), "Gametogenesis and the Early Embryo", 177-194
Allan R. Liss, New York

Auffray, C., Rougeon, F. (1980)
Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA
Eur. J. Biochem. **107**, 303-314

Ball, E.E., Ho, R.K., Goodman, C.S. (1985)
Muscle development in the grasshopper embryo 1. Muscles, nerves and apodemes in the metathoracic leg
Dev. Biol. **111**, 383-398

Banerji, J., Olson, L., Schaffner, W. (1983)
A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes
Cell **33**, 729-740

Barad, M., Jack, T., Chadwick, R., McGinnis, W. (1988)
A novel, tissue-specific, *Drosophila* homeobox gene
EMBO J. **7**, 2151-2161

Batterham, P., Lovett, J.A., Starmer, W.T., Sullivan, D.T. (1983a)
Differential regulation of duplicate alcohol dehydrogenase genes in *Drosophila mojavensis*
Dev. Biol. **96**, 346-354

Batterham, P., Gritz, E., Starmer, W.T., Sullivan, D.T. (1983b)
Biochemical characterization of the products of the *adh* loci of *Drosophila mojavensis*
Biochem. Genet. **21**, 871

Bender, W., Spierer, P., Hogness, D.S. (1983)
Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster*
J. Mol. Biol. **168**, 17-33

Benoist, C., Chambon, P. (1981)
In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region
Nature **290**, 304-310

Benton, W.D., Davis, R.W. (1977)
Screening of recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*
Science **196**, 180-182

Benyajati, C., Spoerel, N., Haymerle, H., Ashburner, M. (1983)
The messenger RNA for alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* differs in its 5′ end in different developmental stages
Cell **33**, 125-133

Berk, A., Sharp, P. (1977)
Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids
Cell **12**, 721-732

Bialojan, S. (1985)
Untersuchung der ß-Tubulin-Genfamilie und Telomer-spezifischer DNA-Segmente aus *Drosophila melanogaster*
Dissertation, Universität Heidelberg

Bialojan, S., Falkenburg, D., Renkawitz-Pohl, R. (1984)
Characterization and developmental expression of ß tubulin genes in *Drosophila melanogaster*
EMBO J. **3**, 2543-2548

Bienz, M., Saari, G., Tremml, G., Müller, J., Züst, B., Lawrence, P.A. (1988)
Differential regulation of *Ultrabithorax* in two germ layers of *Drosophila*
Cell **53**, 567-576

Binder, L.I., Frankfurter, A., Rebhun, L.I. (1985)
The distribution of tau in the mammalian central nervous system
J. Cell Biol. **101**, 1371-1378

Bingham, P.M., Levis, R., Rubin, G.M. (1981)
Cloning of DNA sequences from the *white* locus of *D. melanogaster* by a novel and general method
Cell **25**, 693-704

Bingham, P.M., Chou, T., Mims, I., Zachar, Z. (1988)
On/off regulation of gene expression at the level of splicing
Trends Genet. **4**, 131-138

Bloom, G.S., Luca, F.C., Vallee, R.B. (1984)
Widespread cellular distribution of MAP-1A (microtubule-associated protein 1A) in the mitotic spindle and on interphase microtubules
J. Cell Biol. **98**, 331-340

Bodmer, R., Barbel, S., Shepherd, S., Jack, J.W., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1987)
Transformation of sensory organs by mutations of the *cut* locus of *D. melanogaster*
Cell **51**, 293-307

Bogaert, T., Brown, N., Wilcox, M. (1987)
The *Drosophila PS2* antigen is an invertebrate integrin that, like the fibronectin receptor, becomes localized to muscle attachments
Cell **51**, 929-940

Boggs, R.T., Gregor, P., Idriss, S., Belote, J.M., McKeown, M. (1987)
Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene
Cell **50**, 739-747

Bolivar, F., Rodrigues, R.L. Betlach, M.C., Boyer, H.W. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles
1. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9
Gene **2**, 75-93

Boulay, J.L., Dennefeld, C., Alberga, A. (1987)
The *Drosophila* developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers
Nature **330**, 395-398

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969)
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. **41**, 459-472

Breitling, F., Little, M. (1986)
Carboxyterminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope localization of YOL1/34, DM1A and DM1B
J. Mol. Biol. **189**, 367-370

Bucher, P., Trifonov, E.N. (1986)
Compilation and analysis of eukaryotic POL II promotor sequences
Nucl. Acids Res. **14**, 10009-10026

Büscher, M., Reiser, W., Will, H., Schaller, H. (1985)
Transcripts and the putative RNA pregenome of duck Hepatitis B Virus: implications for reverse transcription
Cell, **40**, 717-724

Campos-Ortega, J.A. (1983)
Topological specificity of phenotype expression of neurogenic mutations in *Drosophila*
Roux`s Arch. Dev. Biol **192**, 317-326

Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V. (1985)
"The embryonic development of *Drosophila melanogaster*"
Springer, Berlin Heidelberg New York

Chen, E.J., Seeburg, P.H. (1985)
Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA
DNA **4**, 165-170

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979)
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclese
Biochemistry **18**, 5294-5297

Chou, T.-B., Zachar, Z., Bingham, P.M. (1987)
Developmental expression of a regulatory gene is programmed at the level of splicing
EMBO J. **6**, 4095-4104

Cleveland, D.W., Sullivan, K.F. (1985)
Molecular biology and genetics of tubulin
Ann. Rev. Biochem. **54**, 331-365

Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984)
A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX
Nucl. Acids Res. **12**, 387-395

DiNardo, S., Sher, E., Heemskerk-Jongens, J., Kassis, J.A., O`Farrell, P.H. (1988)
Two-tired regulation of spatially patterned *engrailed* gene expression during *Drosophila* embryogenesis
Nature **332**, 604-609

Efstradiatis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O`Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissmann, S.M., Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C., Proudfoot, N.J. (1980)
The structure and evolution of the human ß-globin gene family
Cell **21**, 653-668

Freeman, M., Nüsslein-Volhard, C., Glover, D.M. (1986)
The dissociation of nuclear and centrosomal division in *gnu*, a mutation causing giant nuclei in *Drosophila*
Cell **46**, 457-468

Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N. (1983)
Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences
J. Mol. Biol. **170**, 827-842

Fulton, C., Simpson, P.A. (1976)
Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multitubulin hypothesis
in: Goldman, R., Pollard, T., Rosenbaum, J.L. (Hrsg.), "Cell Motility", 987-1005
Cold Spring Harbor Press, New York

Gasch, A., Hinz, U., Leiss, D., Renkawitz-Pohl, R. (1988)
The expression of ß1 and ß3 tubulin genes of *Drosophila melanogaster* is spatially regulated during embryogenesis
Mol. Gen. Genet. **211**, 8-16

Gasch, A., Hinz, U., Renkawitz-Pohl, R. (1989)
Intron and upstream sequences regulate expression of the *Drosophila* ß3 tubulin gene in the visceral and somatic musculature, respectively
Proc. Natl. Acad. Sci USA, im Druck

Gasser, S.M., Laemmli, U.K. (1986)
Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*
Cell **46**, 521-530

Gasser, S.M., Laemmli, U.K. (1987)
A glimpse at chromosomal order
Trends Genet. **3**, 16-22

Gaul, U., Jäckle, H. (1987)
How to fill a gap in the *Drosophila* embryo
Trends Genet. **3**, 127-131

Geyer, P.K., Corces, V.G. (1987)
Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*
Genes Dev. **1**, 996-1004

Ghosh, P.K., Reddy, V.B., Piatak, M., Lebowitz, P., Weissman, S.M. (1980)
Determination of RNA sequences by primer directed synthesis and sequencing of their cDNA transcripts
Meth. Enzymol. **65**, 580-595

Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., Tonegawa, S. (1983)
A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene
Cell **33**, 717-728

Gilmore, T.D., Temin, H.M. (1986)
Different localization of the product of the *v-rel* oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T
Cell **44**, 791-800

Goldberg, D.A. (1980)
Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene
Proc. Natl. Acad. Sci USA **77**, 5794-5798

Goldberg, M.L., Posakony, J.W., Maniatis, T. (1983)
Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line
Cell **34**, 59-73

Grunstein, M., Hogness, D. (1975)
Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene
Proc. Natl. Acad. Sci USA **72**, 3961-3965

Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H., Bulinski, J.C. (1984)
Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently *in vivo*
Cell **38**, 779-789

Hall, C.V., Jacob, P.E., Ringold, G.M., Lee, F.J. (1983)
Expression and regulation of *Escherichia coli lacZ* gene fusions in mammalian cells
J. Mol. Appl. Genet. **2**, 101-109

Hartenstein, V. (1988)
Development of *Drosophila* larval sensory organs: spatiotemporal pattern of sensory neurones, peripheral axonal pathways and sensilla differentiation
Development **102**, 869-886

Hayashi, S., Goto, K., Okada, T.S., Kondoh, H. (1987)
Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken δ1-crystallin gene
Genes Dev. **1**, 818-828

Hiromi, Y., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1985)
Control elements of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*
Cell **43**, 603-613

Ho, R.K., Ball, E.E., Goodman, C.S. (1983)
Muscle pioneers: large mesodermal cells that erect a scaffold for developing muscles and motorneurons in grasshopper embryos
Nature **301**, 66-69

Holmes, D.S., Quigley, M. (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Anal. Biochem. **114**, 193-197

Huber, G., Matus, A. (1984)
Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2 , in rat brain
J. Neurosci. **4**, 151-160

Hultmark, D., Klemenz, R., Gehring, W.J. (1986)
Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*
Cell **44**, 429-438

Ingham, P.W. (1988)
The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*
Nature **335**, 25-34

Kalfayan, L., Wensink, P.C. (1982)
Developmental regulation of *Drosophila* α-tubulin genes
Cell **29**, 91-98

Kalnis, A., Otto, K., Rüther, U., Müller-Hill, B. (1983)
Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*
EMBO J. **2**, 593-597

Karess, R.E., Rubin, G.M. (1984)
Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*
Cell **38**, 135-146

Karn, J., Brenner, S., Barnett, L., Cesareni, G. (1980)
Novel bacteriophage λ cloning vector
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5172-5176

Kemphues, K.J., Raff, R.A., Kaufman, T.C., Raff, E.C. (1979)
Mutation in a structural gene for a ß tubulin specific to testis in *Drosophila melanogaster*
Proc. Natl. Acad. Sci USA **76**, 3991-3995

Kemphues, K.J., Kaufman, T.C., Raff, R.A., Raff, E.C. (1982)
The testis-specific ß-tubulin subunit in *Drosophila melanogaster* has multiple functions in spermatogenesis
Cell **31**, 655-670

Klemenz, R., Weber, U., Gehring, W.J. (1987)
The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*
Nucl. Acids Res. **15**, 3947-3959

Kozak, M. (1984)
Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs
Nucl. Acids Res. **12**, 857-872

Laski, F.A., Rio, D.C., Rubin, G.M. (1986)
Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing
Cell **44**, 7-19

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedther, H. (1977)
RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination
Biochemistry **16**, 4743-4751

Leiss, D., Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R., Renkawitz-Pohl, R. (1988)
ß3 tubulin expression characterises the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis
Development **104**, 525-531

LeMeur, M., Glanville, N., Mandel, J.L., Gerlinger, P., Palmiter, R., Chambon, P. (1981)
The ovalbumin gene family: hormonal control of X and Y gene transcription and mRNA accumulation
Cell **23**, 561-571

Levine, M. (1988)
Molecular analysis of dorsal-ventral polarity in *Drosophila*
Cell **52**, 785-786

Levine, M., Hoey, T. (1988)
Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors
Cell **55**, 537-540

Lewis, S.A., Lee, M.G.-S., Cowan, N.J. (1985)
Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development
J. Cell Biol. **101**, 852-861

L`Hernault,S., Rosenbaum, J.L. (1985)
Reversal of the posttranslational modification on *Chlamydomonas* flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption
Biochemistry **24**, 473-479

Loyd, J.E., Raff, E.C., Raff, R.A. (1981)
Site and timing of synthesis of tubulin and other proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*
Dev. Biol. **86**, 272-284

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982)
"Molecular cloning: A laboratory manual"
Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J.A. (1987)
Regulation of inducible and tissue-specific gene expression
Science **236**, 1237-1245

Martin, P., Martin, A., Osmani, A., Sofer, W. (1986)
A transient expression assay for tissue-specific gene expression of alcohol dehydrogenase in *Drosophila*
Dev. Biol. **117**, 574-580

Maxam, M.A., Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA
Proc. Natl. Acad. Sci USA **74**, 560-564

Maxam, M.A., Gilbert, W. (1980)
Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages
Methods Enzymol. **65**, 499-560

Michiels, F., Falkenburg, D., Müller, A.M., Hinz, U., Otto, U., Bellmann, R., Glätzer, K.H., Brand, R., Bialojan, S., Renkawitz-Pohl, R. (1987)
Testis-specific ß2 tubulins are identical in *Drosophila melanogaster* and *D. hydei* but differ from the ubiquitous ß1 tubulin
Chromosoma **95**, 387-395

Mirkovitch, J., Mirault, M.-E., Laemmli, U.K. (1984)
Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold
Cell **39**, 223-232

Mischke, D., Pardue, M.L. (1982)
Organization and Expression of α-tubulin genes in *Drosophila melanogaster*. One member of the α-tubulin multigene family is transcribed in both oogenesis and later embryonic development
J. Mol. Biol. **156**, 449-466

Mitchison, T.J., Sedat, J. (1983)
Localisation of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos
Dev. Biol. **99**, 261-264

Natzle, J.E., McCarthy, B.J. (1984)
Regulation of *Drosophila* α and ß tubulin genes during development
Dev. Biol. **104**, 187-198

Nevins, J.R. (1983)
The pathway of eukaryotic mRNA formation
Ann. Rev. Biochem. **52**, 441-466

Nüsslein-Volhard, C. (1979)
Maternal effect mutations that alter the spatial coordinates of the embryo of *Drosophila melanogaster*
in: Subtelney, S., Königsberg, I.R. (Hrsg), "Determinants of spatial organization", 185-211
Academic Press, New York

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Kluding, H. (1984)
Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* I. Zygotic loci on the second chromosome
Roux`s Arch. Dev. Biol. **193**, 267-282

Nüsslein-Volhard, C., Frohnhöfer, A.G., Lehmann, R. (1987)
Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*
Science **238**, 1675-1681

O`Kane, C.J., Gehring, W.J. (1987)
Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*
Proc. Natl. Acad. Sci USA **84**, 9123-9127

Oliver, C.P. (1976)
Historical introduction
in: Ashburner, M., Novitski, F. (Hrsg.), "The genetics and biology of *Drosophila*", Band 1a, 1-30
Academic Press, London

Padgett, R.W., St. Johnston, R.D., Gelbart, W.M. (1987)
A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-ß family
Nature **325**, 81-84

Pardue, M.L. (1986)
In situ hybridization to DNA of chromosomes and nuclei
in: Roberts, D.B. (Hrsg.), "*Drosophila*: a practical approach", 111-137
IRL Press, Oxford

Pratt, L.F., Okamura, S., Cleveland, D.W. (1987)
A divergent testis-specific α-tubulin isotype that does not contain a coded C-terminal tyrosine
Mol. Cell. Biol. **7**, 552-555

Pirotta, V., Hadfield, C., Pretorius, G.H.J. (1983)
Microdissection and cloning of the *white* locus and the 3B1-3C2 region of the *Drosophila* X chromosome
EMBO J. **2**, 927-934

Raff, E.C. (1984)
Genetics of microtubule systems
J. Cell Biol. **99**, 1-10

Raff, E.C., Fuller, M.T., Kaufman, T.C., Kemphues, K.J., Rudolph, J.E., Raff, R.A. (1982)
Regulation of tubulin gene expression during embryogenesis in *Drosophila melanogaster*
Cell **28**, 33-40

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977)
Labeling DNA to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I
J. Mol. Biol. **113**, 237-251

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., Nusse, R. (1987)
The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*
Cell **50**, 649-657

Roberts, K., Hyams, J.S. (Hrsg.) (1979)
"Microtubules"
Academic Press, London

Rubin, G.M., Spradling, A.C. (1982)
Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors
Science **218**, 348-353

Rudolph, J.E., Kimble, M., Hoyle, H.D., Subler, M.A., Raff, E.C. (1987)
Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform (ß3), the testes specific isoform (ß2), and an assembly-defective mutation of the testes specific isoform ($B2t^8$) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for beta-tubulin function
Mol. Cell. Biol. **7**, 2231-2242

Sanger, F., Nicklen, S., Coulsen, A.R. (1977)
DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467

Santamaria, P., Nüsslein-Volhard, C. (1983)
Partial rescue of *dorsal*, a maternal effect mutation altering the dorso-ventral pattern of the *Drosophila* embryo, by the injection of wildtype cytoplasm
EMBO J. **2**, 1695-1699

Savakis, C., Ashburner, M., Willis, J.H. (1986)
The expression of the gene coding for alcohol dehydrogenase during the development of *Drosophila melanogaster*
Dev. Biol. **114**, 194-207

Scalenghe, F., Tuvco, E., Edstroem, J.E., Pirotta, V., Melli, M. (1981)
Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes
Chromosoma **82**, 205-216

Scherer, S., Davis, R.W. (1979)
Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4951-4955

Scholnick, S.B., Morgan, B.A., Hirsh, J. (1983)
The cloned dopa decarboxylase gene is developmentally regulated when reintegrated into the *Drosophila* genome
Cell **34**, 37-45

Searles, L.L., Jokerst, R.S., Bingham, P.M., Voelker, R.A., Greenleaf, A.L. (1982)
Molecular cloning of sequences from a *Drosophila* RNA polymerase II locus by P element transposon tagging
Cell **31**, 585-592

Serfling, E., Jasi, M., Schaffner, W. (1985)
Enhancers and eukaryotic transcription
Trends Genet. **1**, 224-230

Shapira, S.K., Chou, J., Richaud, F.V., Casadaban, M.J. (1983)
New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of ß-galactosidase
Gene **25**, 71-82

Shore, E.M., Guild, G.M. (1987)
Closely linked DNA elements control the expression of the *Sgs-5* glue protein gene in *Drosophila*
Genes Dev. **1**, 829-839

Simpson, P. (1983)
Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos
Genetics **105**, 615-632

Snyder, M., Hunkapiller, M., Yuen, D., Silvert, D., Fristrom, J., Davidson, N. (1982)
Cuticle protein genes of *Drosophila*: structure, organization and evolution of four clustered genes
Cell **29**, 1027-1040

Soeller, W.C., Poole, S.J., Kornberg, T. (1988)
In vitro transcription of the *Drosophila engrailed* gene
Genes Dev. **2**, 68-81

Spradling, A.C., Rubin, G.M. (1982)
Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes
Science **218**, 341-347

Spradling, A.C., Rubin, G.M. (1983)
The effect of chromosomal position on the expression of the *Drosophila* xanthine dehydrogenase gene
Cell **34**, 47-57

Steller, H. (1984)
Gentransfer in *Drosophila* zum Studium der Struktur, Funktion und Regulation klonierter Gene
Dissertation, Universität Heidelberg

Steller, H., Pirotta, V. (1984)
Regulated expression of genes injected into early *Drosophila* embryos
EMBO J. **3**, 165-173

Steller, H., Pirotta, V. (1985)
Fate of DNA injected into early *Drosophila* embryos
Dev. Biol. **109**, 54-62

Steward, R. (1987)
Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, *c-rel*
Science **238**, 692-694

Steward, R., Zusman, S.B., Huang, L.H., Schedl, P. (1988)
The *dorsal* protein is distributed in a gradient in early *Drosophila* embryos
Cell **55**, 487-495

Sturtevant, A.H. (1965)
"A history of Genetics"
Harper and Row, New York

Sullivan, K.F., Cleveland, D.W. (1986)
Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate ß tubulin polypeptide classes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 4327-4331

Sullivan, K.F., Lau, J.T.Y., Cleveland, D.W. (1985)
Apparent gene conversion between ß-tubulin genes yields multiple regulatory pathways for a single ß-tubulin polypeptide isotype
Mol. Cell Biol. **5**, 2454-2465

Technau, G.M. (1987)
A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*
Development **100**, 1-12

Theurkauf, W.E., Baum, H., Bo, J., Wensink, P.C. (1986)
Tissue-specific and constitutive α-tubulin genes of *Drosophila melanogaster* code for structurally distinct proteins
Proc. Natl. Acad. Sci USA **86**, 8477-8481

Thisse, B., El Messal, M., Perrin-Schmitt, F. (1987a)
The *twist* gene: isolation of a zygotic gene necessary for the establishment of dorso-ventral pattern
Nucl. Acids Res. **15**, 3439-3453

Thisse, B., Stoetzel, C., El Messal, M., Perrin-Schmitt, F. (1987b)
Genes of the *Drosophila* maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *twist* in presumptive mesodermal cells
Genes Dev. **1**, 709-715

Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., Perrin-Schmitt, F. (1988)
Sequence of the *twist* gene and nuclear localization in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos
EMBO J. **7**, 2175-2183

Vieira, J., Messing, J. (1982)
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal synthetic primers
Gene **19**, 259-268

Weaver, R.F., Weissman, C. (1979)
Mapping of a RNA by a modification of the Berk-Sharp: the 5′ termini of 15S ß-globin mRNA precursor and mature 10S ß-globin mRNA have identical map coordinates
Nucl. Acids Res. **7**, 1175-1193

Wilimzig, M. (1985)
LiCl-boiling method for plasmid mini-preps
Trends Genet. **1**, 158

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L., Treiber, G. (1970)
Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification
Virology **40**, 734-744

Zachar, Z., Chou, T.-B., Bingham, B.M. (1987)
Evidence that a regulatory gene autoregulates splicing of its transcript
EMBO J. **6**, 4105-4111

LEBENSLAUF

Geburtsdatum:	17. 6. 1960
Geburtsort:	Berlin
Schulen:	
1967 - 1970	Grundschule, Wiesbaden
1970 - 1979	Gymnasium, Diltheyschule, Wiesbaden
Juni 1979	Abitur
akademische Ausbildung:	
Oktober 1979 - September 1981	Studium der Biologie an der Universität Freiburg
September 1981	Vordiplom
Oktober 1981 - April 1985	Studium der Biologie an der Universität Heidelberg
Mai 1984 - März 1985	Diplomarbeit, "Versuche zur Identifizierung von RNA-PolymeraseII-Genen aus *Drosophila melanogaster*", unter Anleitung von Prof. Dr. E.K.F. Bautz am Institut für molekulare Genetik der Universität Heidelberg
April 1985	Diplom
April 1985 - Januar 1989	Doktorarbeit unter Anleitung von Dr. habil. R. Renkawitz-Pohl im Genzentrum des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried